

Estudio de posibles biomarcadores para la prevalencia e incidencia de la osteoartritis de rodilla: dinámica del telómero y haplogrupo de ADN mitocondrial

Rebeca María Guillén Fajardo

Tesis doctoral

2024

Director y Tutor: Dr. José Luis Fernández García

Programa oficial de doctorado en Biología Celular, Molecular y Genética



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

El Dr. **José Luis Fernández García**, Jefe de la Unidad de Genética Clínica y Molecular del CHUAC y del grupo de Investigación de Daño en el ADN y Cromosomas-Toxicogenética del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC),

CERTIFICA:

Que Dña. **Rebeca María Guillén Fajardo**, Graduada en Bioquímica por la Universidad de Murcia, realizó bajo mi supervisión el trabajo que lleva por título **“ESTUDIOS DE POSIBLES BIOMARCADORES PARA LA PREVALENCIA E INCIDENCIA DE LA OSTEOARTRITIS DE RODILLA: DINÁMICA DEL TELÓMERO Y HAPLOGRUPO DE ADN MITOCONDRIAL”**. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de doctor en Biología Celular, Molecular y Genética

Fdo. José Luis Fernández García

En A Coruña, 19 de Enero de 2024

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento de escribir las últimas líneas de esta tesis en agradecimiento a las personas que han confiado en mí y me han ayudado cada día, no solo en esta tesis, sino a lo largo de toda esta etapa.

A mi director de tesis, Dr. José Luis Fernández, agradecerle la oportunidad depositada en mí para la realización de este proyecto. Gracias por tus continuos consejos y recomendaciones durante estos años, tanto a nivel laboral como personal. Gracias por todo lo aprendido, a veces a la primera y otras veces a base de ensayo y error.

Gracias al Servicio de Genética Clínica y Molecular del CHUAC y al Laboratorio de Genética Molecular y Radiobiología del Centro Oncológico de Galicia por su colaboración, especialmente a Alejandro Mosquera por su ayuda constante en análisis moleculares y estadísticos. Gracias a Isidoro, Montse, Nerea, Arantxa, Raquel, Loli y demás personal por hacerme sentir como en casa. Los comienzos siempre son duros, pero me acogisteis como una más y con vosotros descubrí la importancia del trabajo en equipo.

A Fátima, mi compañera de laboratorio, gracias por todas las horas laborales y personales compartidas. Gracias por todo lo que me has enseñado durante esta bonita, aunque estresante, etapa. Compañera leal y ahora amiga. También gracias Ana, llegaste más tarde al laboratorio, pero tu presencia fue un apoyo y un soplo de aire nuevo.

Gracias al Servicio de Reumatología del CHUAC por su cooperación con este proyecto, sobre todo al Dr. Francisco Javier Blanco y Dr. Ignacio Rego por su ayuda en el desarrollo de este trabajo.

Y hora llega la parte más difícil. Agradecer a las personas que, aunque no han influido directamente en esta etapa de mi camino, forman parte de mi vida y me hacen ser quien soy a día de hoy.

Agradecer a toda mi familia por ser la energía que me ha permitido caminar durante esta etapa.

Gracias a mis padres, Pepe y Tere, por sacrificar sus vidas para que pudiese cumplir mi sueño, aun expensas de los suyos propios. Gracias por estar en los buenos y malos momentos, sobretodo en estos últimos. Sois los mejores padres que una hija podría tener.

Gracias a mi hermano, José Daniel, por ser un pilar en mi vida. Sé que nos peleamos constantemente, pero tengo tu apoyo incondicional. Y a mi pequeña Lola, el gran descubrimiento de mi vida.

Gracias a mis amigas, Mamen, Ana, María y Cristina, por mantenerme cuerda durante todo este tiempo y, por supuesto, estar para todo lo que he necesitado. Soy una afortunada de teneros en mi vida.

Muchas gracias a todos. Espero que podáis sentirnos orgullosos de mí.

El trabajo de esta tesis se ha realizado en virtud del Proyecto de Investigación en Salud **PI17/01987** del Instituto de Salud Carlos III, **“Análisis dinámico de parámetros de fisiología telomérica, como marcadores de incidencia y/o progresión de osteoartritis”**.

RESUMO

A artrose (OA), ou enfermidade articular dexenerativa, é común en persoas maiores de 65 anos, sendo unha causa importante de incapacidade laboral. Unha das articulacións máis afectadas é o xeonllo. Este estudo analizou a dinámica de perda das secuencias teloméricas en leucocitos do sangue periférico despois de 6 anos de seguimento e o haplogrupo do ADN mitocondrial (ADNmt), como posibles factores de risco para a condición no momento do recrutamento (prevalencia) e/ou do inicio durante o seguimento (incidencia) da OA de xeonllo, avaliada radiolóxicamente. Os individuos estudados pertencen ao consorcio *Osteoarthritis Initiative* (OAI) dos EEUU. O número de secuencias teloméricas determinouse mediante qPCR específica e o haplogrupo do ADNmt mediante PCR-RFLP co método de extensión dunha única base. A porcentaxe relativa de perda das secuencias teloméricas nos leucocitos demostrou ser un factor de risco independente asociado ao desenvolvemento da OA de xeonllo. Os portadores do clúster de haplogrupo de mtDNA HV mostraron unha maior incidencia que os portadores do clúster JT, así como unha maior perda das secuencias teloméricas. O maior acurtamento dos telómeros nos leucocitos dos individuos incidentes podería ser indicativo dun envellecemento sistémico acelerado que potenciaría a dexeneración da cartilaxe.

Palabras chave: *osteoartrite, telómero, ADNmt, porcentaxe relativa de perda das secuencias teloméricas, incidencia, prevalencia.*

RESUMEN

La osteoartritis (OA), o enfermedad degenerativa articular, es común en individuos mayores de 65 años, siendo una causa importante de incapacidad laboral. Una de las articulaciones más afectadas es la rodilla. Este estudio analizó la dinámica de pérdida de secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica tras 6 años de seguimiento y el haplogrupo de ADN mitocondrial (ADNmt), como posibles factores de riesgo para el padecimiento en el momento de reclutamiento (prevalencia) y/o aparición durante el seguimiento (incidencia) de OA de rodilla, evaluada radiológicamente. Los individuos estudiados pertenecen al consorcio *Osteoarthritis Initiative* (OAI) de EEUU. La cantidad de secuencias teloméricas fue determinada mediante una qPCR específica y el haplogrupo de ADNmt mediante PCR-RFLP con el método de extensión de una sola base. Se demostró que el porcentaje relativo de pérdida de secuencias teloméricas en leucocitos es un factor de riesgo independiente asociado con la aparición de la OA de rodilla. Los portadores del clúster de haplogrupo de ADNmt HV evidenciaron una mayor incidencia que los portadores del clúster JT, al igual que una mayor pérdida de secuencias teloméricas. El mayor acortamiento telomérico en leucocitos de individuos incidentes podría ser indicativo de un envejecimiento sistémico acelerado que potenciaría la degeneración del cartílago.

Palabras clave: *osteoartritis, telómero, ADNmt, porcentaje relativo de pérdida de las secuencias teloméricas, incidencia, prevalencia.*

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease, which is very common between people aged >65 years old. It is also one of the major causes of occupational disability. Knee is one of the most affected joints. In this study, we analyzed the dynamics of telomeric DNA sequence loss in peripheral blood leukocytes (PBL) after a 6 years follow-up and the mitochondrial DNA haplogroup (mtDNA), as possible risk factors for suffering knee OA at the recruitment (prevalence) or for developing it during follow-up (incidence). The diagnosis was performed by radiologic images. The subjects studied belong to the *Osteoarthritis initiative* (OAI) from EEUU. The amount of telomeric sequences was determined by specific qPCR whereas mtDNA haplogroup was determined by PCR-RFLP using the single base extension method. It was evidenced that the relative percentage of telomeric sequences loss in PBL is an independent risk factor associated with knee OA onset. Carriers of mtDNA HV haplogroup cluster showed a higher incidence of OA and telomeric sequence loss than carriers of JT cluster. The higher telomere shortening found in leukocytes from patients who develop OA could be indicative of an accelerated systemic aging process that would potentiate cartilage degeneration.

Keywords: *osteoarthritis, telomere, DNAm, relative percentage of telomeric sequences loss, incidence, prevalence.*

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	5
<i>INTRODUCCIÓN</i>	9
1. Cartílago articular	10
1.1 Estructura del cartílago	10
1.2 Elementos del cartílago	11
2. Osteoartritis	13
2.1 Definición e impacto.....	13
2.2 Clasificación.....	14
2.3 Epidemiología	15
2.4 Factores de riesgo	17
2.5 Fisiopatología	20
2.5.1 Cartílago articular.....	20
2.5.2 Membrana sinovial.....	21
2.5.3 Hueso subcondral.....	22
2.6 Manifestaciones clínicas	23
2.7 Diagnóstico y evaluación	23
2.8 Pronóstico.....	27
2.9 Tratamiento.....	27
2.9.1 Tratamiento no farmacológico.....	28
2.9.2 Tratamiento farmacológico.....	28
2.9.3 Tratamiento quirúrgico.....	29
2.10 Prevención.....	29
3. Telómero	30
3.1 Definición y papel funcional	30

3.2 Estructura	30
3.2.1 ADN telomérico.....	30
3.2.2 Componentes proteicos: complejo shelterina o telosoma.....	31
3.3 Histonas y sus modificaciones epigenéticas.....	32
3.4 TERRA (<i>telomere repeat containing RNAs</i>).....	33
3.5 Problema de la replicación terminal.....	34
3.6 Telomerasa y ALT.....	36
3.7 Envejecimiento asociado al telómero.....	38
3.8 Leucocitos de sangre periférica como biomarcador de la longitud-tamaño del telómero	40
3.9 Telómeros y artrosis, en condrocitos y en leucocitos de sangre periférica	41
4. Haplogrupos del ADN mitocondrial.....	44
4.1 Generalidades de la mitocondria	44
4.2 Genoma mitocondrial.....	47
4.3 Generalidades y origen de los haplogrupos mitocondriales.....	48
4.4 Importancia de los grupos mitocondriales en la artrosis	50
OBJETIVOS	52
Objetivo 1. Evaluar la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas en muestras de leucocitos de sangre periférica, con el fin de predecir la prevalencia y la incidencia de OA en rodilla.....	53
Objetivo 2. Evaluar la relación del haplogrupo de ADN mitocondrial y la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas como biomarcadores de la incidencia de la OA en rodilla.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS	54
1. Individuos de estudio y obtención de muestras	55
2. Medida de la longitud relativa media de las secuencias teloméricas por PCR cuantitativa	57

3. Determinación de los haplogrupos de ADN mitocondrial	62
4. Análisis estadístico de los resultados	67
<i>RESULTADOS</i>	69
Resultados del objetivo 1. Evaluar la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas en muestras de leucocitos de sangre periférica, con el fin de predecir la prevalencia y la incidencia de OA en rodilla.	70
1. Características de las diferentes cohortes: No incidente, incidente y prevalente	70
2. Estudio de la prevalencia en OA de rodilla radiográfica	71
3. Estudio de la incidencia en OA de rodilla radiográfica	73
Resultados del objetivo 2. Evaluar la relación del haplogrupo de ADN mitocondrial y la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas como biomarcadores de la incidencia de la OA en rodilla.	76
<i>DISCUSIÓN</i>	81
<i>CONCLUSIONES</i>	92
Conclusiones del objetivo 1. Evaluar la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas en muestras de leucocitos de sangre periférica, con el fin de predecir la prevalencia y la incidencia de OA en rodilla.	93
Conclusiones del objetivo 2. Evaluar la relación del haplogrupo de ADN mitocondrial y la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas como biomarcadores de la incidencia de la OA en rodilla.	93
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	94
<i>PUBLICACIONES</i>	108
Publicaciones asociadas a la tesis doctoral	109
Otras publicaciones.....	109
Patente.....	109
<i>ANEXO I</i>	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las capas del cartílago.

Figura 2. Clasificación de la OA.

Figura 3. Ratios de incidencia estandarizados por edad y sexo de OA de rodilla, cadera y mano en toda la población, en mujeres y en hombres.

Figura 4. Esquema de los factores de riesgo de OA.

Figura 5. Cambios estructurales en el desarrollo de la osteoartritis.

Figura 6. Cuestionario WOMAC para evaluar la OA de rodilla y cadera.

Figura 7. Procedimiento a seguir para el tratamiento de la osteoartritis.

Figura 8. Representación de la estructura del telómero.

Figura 9. Modificaciones epigenéticas en la cromatina del centrómero y telómero de los cromosomas de los mamíferos.

Figura 10. Esquema del problema de la replicación terminal del telómero.

Figura 11. Estructura de la telomerasa.

Figura 12. Alargamiento alternativo de los telómeros (ALT).

Figura 13. Estructura de la mitocondria.

Figura 14. Representación esquemática del genoma mitocondrial humano.

Figura 15. Mapa distributivo de los principales haplogrupos mitocondriales.

Figura 16. Hibridación de los cebadores directo (*forward*) e indirecto (*reverse*) del telómero en el ADN telomérico.

Figura 17. Protocolo a seguir para la cuantificación de las secuencias teloméricas en muestras de sangre.

Figura 18. Esquema jerárquico recomendado para identificar los haplogrupos de ADN mitocondrial.

Figura 19. Representación gráfica del porcentaje relativo de la pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos de sangre periférica en OA de rodilla no incidente, incidente y prevalente.

Figura 20. Porcentaje relativo de la pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos de sangre periférica en individuos con clúster de ADNmt JT y HV. Porcentaje relativo de la pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos de sangre periférica en individuos

no incidentes e incidentes de OA de rodilla. Porcentaje relativo de la pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos de sangre periférica en individuos no incidentes e incidentes de OA de rodilla con clúster de ADNmt JT y en individuos no incidentes e incidentes de OA de rodilla con clúster de ADNmt HV.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios de prevalencia de OA de rodilla, mano y cadera en Europa.

Tabla 2. Tipos de factores de riesgo, ejemplos y características.

Tabla 3. Clasificación de la OA según la escala de Kellgren-Lawrence.

Tabla 4. Sitios polimórficos del ADNmt utilizados para asignar los principales haplogrupos mitocondriales europeos.

Tabla 5. Datos cohortes OAI.

Tabla 6. Secuencia de los cebadores del telómero y 36B4.

Tabla 7. Condiciones de la qPCR.

Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados para la PCR Multiplex, PCR-RFLP y reacción de SBE.

Tabla 9. Condiciones de la PCR multiplex.

Tabla 10. Condiciones de la SBE.

Tabla 11. Características de las diferentes cohortes.

Tabla 12. Evaluación del porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica de individuos de la cohorte OAI.

Tabla 13. Prevalencia radiográfica de OA de rodilla.

Tabla 14. Evaluación del porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica de los individuos no incidentes, incidentes y prevalentes de la cohorte OAI, mediante el test *Kruskal Wallis*.

Tabla 15. Incidencia radiográfica de OA de rodilla.

Tabla 16. Valores estadísticos del porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica y análisis de las diferencias significativas en individuos no incidentes e incidentes de OA de rodilla, en individuos con clúster de ADNmt HV o JT.

Tabla 17. Análisis multivariante mediante regresión logística binaria de la incidencia radiográfica de OA de rodilla en individuos con clúster JT y HV cuando se introducen en el estudio las variables: porcentaje relativo de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica y el clúster de ADNmt.

Tabla 18. Análisis de regresión logística en la incidencia radiográfica de OA de rodilla estratificada por clúster JT y HV, utilizando como variable el porcentaje relativo de pérdida de las secuencias teloméricas.

Tabla 19. Incidencia radiográfica de OA de rodilla en individuos con clúster JT y HV.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

µl: microlitro

µM: micromolar

Acetil-CoA: acetil coenzima A

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ADP: adenosín difosfato

AINEs: antiinflamatorios no esteroideos

ALT: alargamiento alternativo de los telómeros

APB: cuerpos PML asociados a ALT

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ARN ribosómico

ARNt: ARN transferente

ATM: *ataxia telangiectasia mutated*

ATP: adenosín trifosfato

ATR: *ATM and Rad3-related*

BMD: densidad mineral ósea

CILP: *intermediate-layer protein*

Cl⁻: ion cloruro

CMP: proteína de la matriz del cartílago (*cartilage matrix protein; matrilin-1*)

CO₂: dióxido de carbono

COMP: proteína oligomérica de la matriz del cartílago (*cartilage oligomeric matrix protein*)

CST: *heterotrimeric protein complex*

Ct (Cq): ciclo de cuantificación

CTC1: *CST telomere replication complex component 1*

CTE: cadena de transporte electrónico

CV: coeficiente de variación

Cyt b: citocromo b oxido-reductasa

Da: dalton

DAMP: patrones moleculares asociados a daño

DCK1: disquerina (*dyskerin*)

ddNTPs: didesoxinucleótidos trifosfato

DDR: respuesta a daño del ADN (*DNA damage response*)

D-loop: región control (*displacement-loop*)

DNMT: ADN metiltransferasa

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato (*Deoxynucleotide triphosphates*)

FADH₂: flavín adenín dinucleótido de flavina y adenina (forma reducida)

GAGs: glicosaminoglicanos

GAR1: codifica la subunidad 1 del complejo ribonucleoproteínico H/ACA (*encoding H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1*)

GDF5: factor 5 de diferenciación y crecimiento (*growth differentiation factor 5*)

GPx: glutatión peroxidasa

Grado K/L: grado de Kellgren/Lawrence

GTP: guanosín trifosfato

GWAS: estudio de asociación del genoma completo (*genome-wide association study*)

H⁺: protón

H₂O: agua

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HDR: reparación dirigida por homología (*Homology-directed repair*)

HOOS: *the Hip Disability and Osteoarthritis Outcome Score*

HP1: proteína heterocromatina 1 (*heterochromatin protein 1*)

hRAP1: proteína activadora/represora humana 1 (*repressor/activator protein human 1*)

IC: intervalos de confianza

IL-1 β : interleucina 1 beta

IMC: índice de masa corporal

K⁺: ion potasio

Kv: kilovoltios

KOOS: *Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score*

MEC: matriz extracelular

MM: master mix

mM: micromolar

MME: membrana mitocondrial externa

MMI: membrana mitocondrial interna

n: número de datos

Na⁺: ion sodio

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

Ng: nanogramo

NHEJ: recombinación no homóloga, unión de extremos no homólogos (*non-homologous DNA end joining*)

NO: óxido nítrico

NOP 10: proteína 10 nucleolar (*nucleolar protein 10*)

NTC: *no template control*

O²⁻: anión superóxido

O₂: oxígeno

OA: osteoartritis (artrosis)

OAI: *Osteoarthritis Initiative*

OARSI: *Osteoarthritis Research Society International*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: *odds ratio*

OXPHOS: fosforilación oxidativa (*oxidative phosphorylation*)

P53: proteína supresora de tumores

Pb: pares de bases

PBL: leucocitos de sangre periférica (*periferal blood leucocytes*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCR-RFLP: PCR de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*PCR–restriction fragment length polymorphism*)

PGE-2: prostaglandina E2

Pi: fosfato inorgánico

PML: leucemia promielocítica

POT 1: protección de los telómeros 1 (*protector of the telomeres 1*)

PRELP: *proline- and arginin-rich and leucine-rich repeat protein*

PRG4: lubricina

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

R²: coeficiente de correlación lineal

RAGE: productos finales de glicación avanzada

RB1: proteína del retinoblastoma

ROS: especies reactivas de oxígeno

SASP: *senescence-associated secretory phenotype*

SBE: método de la extensión de una sola base (*single-base extension*)

SD: desviación estándar

SNP: polimorfismos de un solo nucleótido

SOD: superóxido dismutasa

STN1: *suppressor of cdc13a*

SYSADOA: *symptomatic slow action drugs for osteoarthritis*

TEN1: *telomeric pathway with STN1*

TERC: componente que actúa como molde de ARN

TERRA: ARN largo no codificante (*telomere repeat containing RNA*)

TERT: subunidad catalítica con actividad transcriptasa inversa

TIN2: *TRF1-interacting nuclear protein 2*

TLRs: receptores tipo Toll (*toll-like receptors*)

T_m: temperatura de *melting*

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TPP1: *tripeptidylpeptidase 1*

TRF1: factor de unión repeticiones teloméricas 1 (*telomere repeat Factor 1*)

TRF2: factor de unión a repeticiones teloméricas 2 (*telomere repeat Factor 2*)

WOMAC: *Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index*

INTRODUCCIÓN

1. Cartílago articular

1.1 Estructura del cartílago

El cartílago articular, localizado en la superficie de las articulaciones que están involucradas en el movimiento mecánico, es un tejido avascular y aneural (1,2). Está compuesto principalmente por agua, diferentes tipos de colágeno, proteoglicanos y células exclusivas de este tejido (condrocitos). Además, en menor medida, en este tejido encontramos glicoproteínas y proteínas no colágenas. Todos estos componentes conforman una enorme matriz extracelular que disminuye con la edad (3,4).

Como se puede ver en la figura 1, el cartílago está dividido en 4 zonas (4-6):

- La **zona superficial o tangencial** está compuesta por abundantes fibras de colágeno, condrocitos aplanados y baja cantidad de proteoglicanos. Es la zona más cercana a la superficie, presenta escasa actividad metabólica y soporta altas fuerzas de cizalla. Ocupa alrededor de un 10-20% del espesor del tejido articular.
- La **zona intermedia o de transición** presenta condrocitos con forma esférica, mayor cantidad de proteoglicanos y menor proporción de colágeno que la zona superficial. Esta zona soporta fuerzas de compresión y tiene elevada actividad metabólica. Representa un 40-60% del volumen total del cartílago.
- La **zona profunda o radial** es rica en proteoglicanos, presenta condrocitos y supone el 30% del volumen total del cartílago. Su principal función es proporcionar la mayor resistencia a las fuerzas de presión gracias a la presencia de fibras de colágeno de mayor diámetro.
- La **zona calcificada** es la capa de anclaje del cartílago al hueso subcondral. Contiene colágeno y condrocitos que expresan un fenotipo hipertrófico capaz de sintetizar matriz calcificada. No presenta proteoglicanos. Además, está separada de la zona profunda por una **línea de flujo (tidemark)**, que permite soportar fuerzas de cizalla.

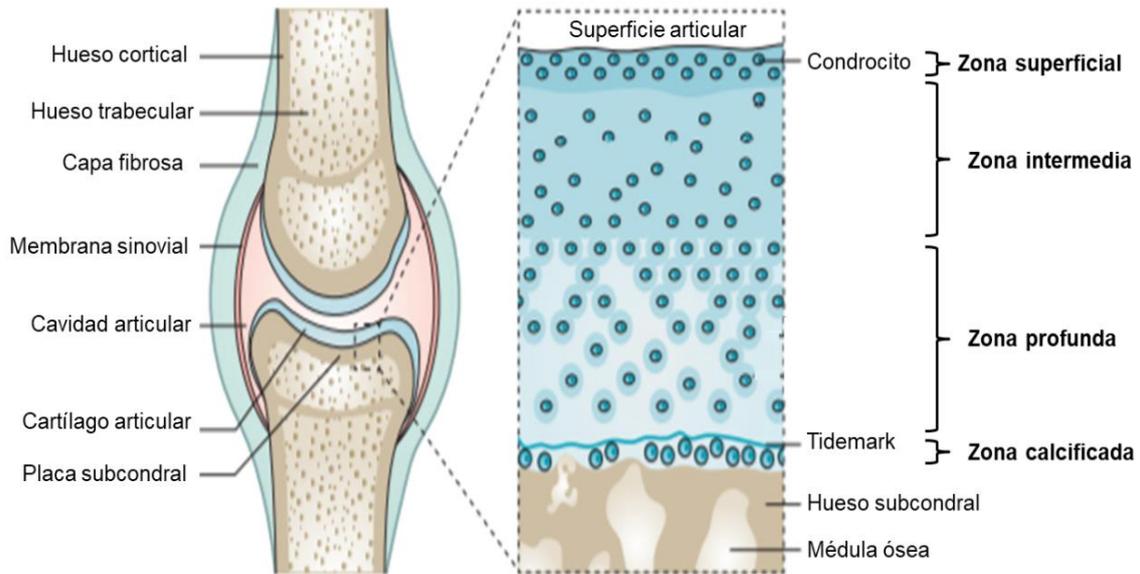


Figura 1. Representación esquemática de las capas del cartílago. Modificada de (6).

1.2 Elementos del cartílago

El **condrocito** es el único tipo celular presente en el cartílago y supone en torno al 2% del volumen total del cartílago (1,3). Es el responsable de la síntesis, mantenimiento y degradación de la matriz extracelular en un estado de equilibrio de bajo recambio. El metabolismo de los condrocitos funciona con una baja tensión de oxígeno, oscilando desde el 10% en la zona superficial a menos del 1% en la zona profunda. Su principal fuente de energía es la glucosa, la cual es obtenida por vía glucolítica y es necesaria en la síntesis de glucosaminoglicanos (5,6). Además, estas células son responsables de responder a cambios producidos por las cargas articulares, las citoquinas, los factores de crecimiento y los mediadores inflamatorios, para mantener la homeostasis del cartílago (3).

La **matriz extracelular (MEC)** tiene un papel importante en la mecánica del cartílago (3). Está compuesta por los siguientes elementos:

- **Agua.** Supone un 60-80% del peso del cartílago (2). Su cantidad desciende en las capas inferiores, siendo alrededor del 80% en la zona superficial y de un 65% en la zona profunda. El agua se distribuye según un gradiente de presión a través del cartílago, lo que permite

transportar nutrientes a los condrocitos y proporcionar función lubricante en la zona superficial (5).

- **Colágeno.** El colágeno tipo II es la principal fibra localizada en el cartílago (3,6,7), en torno al 90% (2). Su función es soportar una gran resistencia a la tensión (2,6). También existen pequeñas cantidades de colágeno tipo I, V, VI, IX, X y XI, que se encargan de participar en la estabilización y formación de la red de colágeno tipo II (3,5). Representa el 60% del peso seco del cartílago (5).
- **Proteoglicanos (PGs).** Son proteínas hidrofílicas que tienen una o varias subunidades de glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs son carbohidratos formados por subunidades de disacáridos, tales como condroitín sulfato, queratán sulfato, dermatán sulfato y el hialuronano o ácido hialurónico (3). Estas proteínas son secretadas por los condrocitos y aportan resistencia a las fuerzas de compresión del cartílago (2,6). Representan el 10-15% del peso del cartílago (5).
- **Proteínas no colágenas y glicoproteínas.** Juegan un papel en la organización, proporcionándole estabilidad al cartílago articular. Entre las proteínas no colágenas podemos encontrar la COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*), la CMP (*cartilage matrix protein* o *matrilin-1*) la CILP (*intermediate-layer protein*), la PRELP (*proline- and arginine-rich and leucine-rich repeat protein*) y la fibronectina. Por otro lado, entre las glicoproteínas destaca la lubricina (PRG4), cuya función es ayudar a reducir la fricción entre los planos en la zona superficial (5,8).

2. Osteoartritis

2.1 Definición e impacto

La Osteoartritis (OA), comúnmente conocida como artrosis, es una enfermedad degenerativa articular crónica, frecuente en la población envejecida (4,9,10). Es considerada la forma más común y prevalente de artritis (4,9,11–13) y supone un gran impacto socioeconómico en todo el mundo (6,14,15). La OA también es clasificada como una enfermedad inflamatoria de bajo grado (16,17).

La OA es el resultado de una serie de perturbaciones a nivel estructural y funcional de las articulaciones sinoviales (11). Esta enfermedad origina alteraciones en el cartílago (6,15), una respuesta inflamatoria local del tejido (11,16) y afectación del hueso subcondral, los meniscos, los ligamentos, los músculos periarticulares y la membrana sinovial (6,11,15,18). El daño articular se localiza principalmente en las articulaciones de la cadera, rodilla y muñeca (4,6), aunque también suelen afectarse las articulaciones de la columna lumbar y cervical (19).

La *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) ha unificado el concepto de artrosis como “desorden de las articulaciones móviles caracterizado por estrés celular y degradación de la matriz extracelular iniciado por una micro o macro lesión que activa la respuesta de reparación mal-adaptativa incluyendo a vías proinflamatorias de la inmunidad innata. Esta enfermedad se manifiesta primero con alteraciones moleculares (metabolismo anormal del tejido tisular) seguido por cambios anatómicos y/o fisiológicos (caracterizados por la degradación del cartílago, remodelado del hueso, formación de osteofitos, inflamación articular y pérdida de la función normal articular) que puede culminar en enfermedad” (5,20).

Según la OMS, la OA es una de las diez enfermedades más incapacitantes en los países desarrollados, causando limitaciones de movimiento en el 80% de los pacientes y, el 25% de ellos, no puede realizar actividades cotidianas (21).

En la actualidad, la combinación del incremento de la esperanza de vida, la obesidad y las lesiones articulares previas de la población están convirtiendo

la OA en un problema grave de salud pública (15). Se estima que el 10% de hombres y el 18% de las mujeres de todo el mundo con edad superior a 60 años presentan síntomas de OA (22,23).

2.2 Clasificación

Hay distintas formas de clasificar la artrosis. La más utilizada se basa en la etiología de esta enfermedad, dividiéndose en primaria (o idiopática) y secundaria (figura 2). La OA primaria hace referencia a la enfermedad degenerativa crónica que está relacionada con el envejecimiento y con otras patologías asociadas. A medida que una persona envejece, disminuye el contenido de agua en las articulaciones, provocando una debilidad y pérdida de resistencia articular. Con respecto a la OA secundaria, suele ser debida a una causa específica, como es un traumatismo previo, anomalías anatómicas o enfermedades metabólicas (6,24). La distinción entre las dos formas no siempre es muy clara. Por ello, la OA primaria se ha clasificado en tres subtipos diferentes. Esta clasificación se basa en características etiopatogénicas, clínicas y de imagen de la artrosis. La OA tipo I está determinada por la genética, la OA tipo II está asociada al déficit de estrógenos y la OA tipo III está relacionada con el envejecimiento (2).

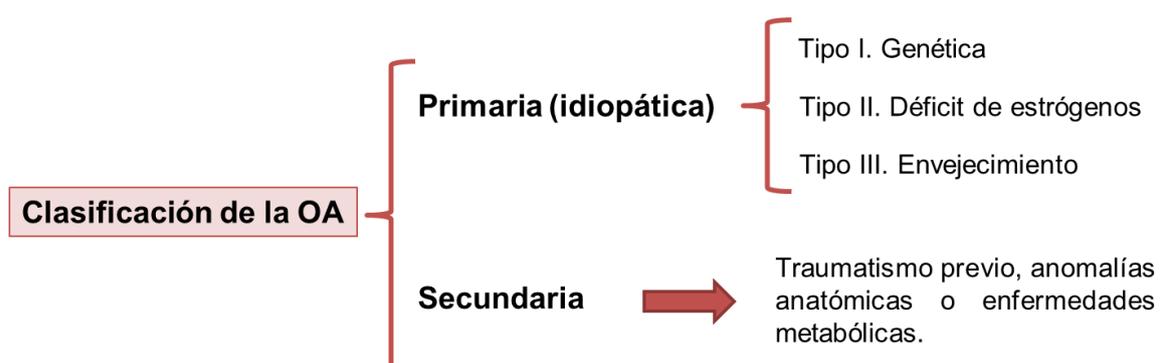


Figura 2. Clasificación de la OA.

2.3 Epidemiología

Se han realizado múltiples estudios epidemiológicos con el objetivo de estimar la frecuencia de OA en las diferentes poblaciones. Es complicado generalizar los resultados con cifras globales de la prevalencia e incidencia, ya que no hay un consenso claro sobre la definición de artrosis, los síntomas iniciales y el umbral del dolor (2).

Por un lado, la **prevalencia de OA** está creciendo en todo el mundo, sobre todo en países industrializados, debido al aumento de la esperanza de vida, lo que ocasionará un incremento de la demanda de los servicios sanitarios en los próximos años (2). Esta prevalencia depende de la definición de OA utilizada, las categorías de edad, la zona geográfica y la distribución poblacional por sexo (15,25). La articulación más prevalente es la rodilla, seguida por la mano y la cadera (15).

Como se puede observar en la tabla 1, en Europa la prevalencia de la OA radiográfica (pruebas radiológicas y exploración física) es mucho mayor que la OA sintomática (exploración física únicamente), sobre todo para las articulaciones de rodilla y mano. Además, la OA de rodilla y mano es más prevalente en mujeres que en hombres, especialmente en la OA sintomática (15). Ahora bien, si nos centramos en España, la prevalencia general de artrosis en la población mayor de 40 años es de un 29,35%. Si vemos la prevalencia por articulaciones, el dato varía en cadera, rodilla y mano, siendo de 5,13%, 13,83% y 7,73%, respectivamente (19).

Hay que tener en cuenta que la definición de OA radiográfica para fines epidemiológicos puede ser un problema, ya que pueden aparecer contradicciones entre las pruebas radiológicas y los hallazgos clínicos. Algunos pacientes pueden presentar un dolor intenso e incapacidad en la articulación, sin apreciarse ningún cambio articular en la radiografía simple. En otros casos, la propia radiología muestra una alteración articular, pero los pacientes presentan pocos o ningún tipo de síntomas (25).

Tabla 1. Estudios de prevalencia de OA de rodilla, mano y cadera en Europa. Extraído y modificado de (15).

	Edad población (años)	Prevalencia en Mujeres (%)	Prevalencia en Hombres (%)
Rodilla			
Radiográfica			
	≥ 22	14	12
	≥ 45	10	4
	≥ 55	29	16
Sintomática			
	≥ 19	9	3
	≥ 50	23	8
	≥ 60	15	9
Cadera			
Radiográfica			
	≥ 20	7	7
	≥ 23	5	11
	≥ 45	19	27
	≥ 55	16	14
	≥ 60	5	11
Sintomática			
	≥ 19	2	0
	≥ 60	8	7
Mano			
Radiográfica			
	≥ 30	48	44
	≥ 50	67	55
Sintomática			
	≥ 19	3	<1

Por otro lado, la **incidencia de la OA** después de los 40 años aumenta dramáticamente con cada década que pasa, siendo mucho mayor en mujeres que en hombres (24). En el caso de España, los ratios de incidencia estandarizados por edad y sexo para OA de mano, cadera y rodilla han sido estimados en 2,4, 2,1 y 6,5 por cada 1000 personas en un año, respectivamente. Los ratios de incidencia de toda la población crecen notablemente desde aproximadamente los 50 años hasta los 70-75 años (figura 3), edad en la que se da el pico de incidencia (15,26,27).

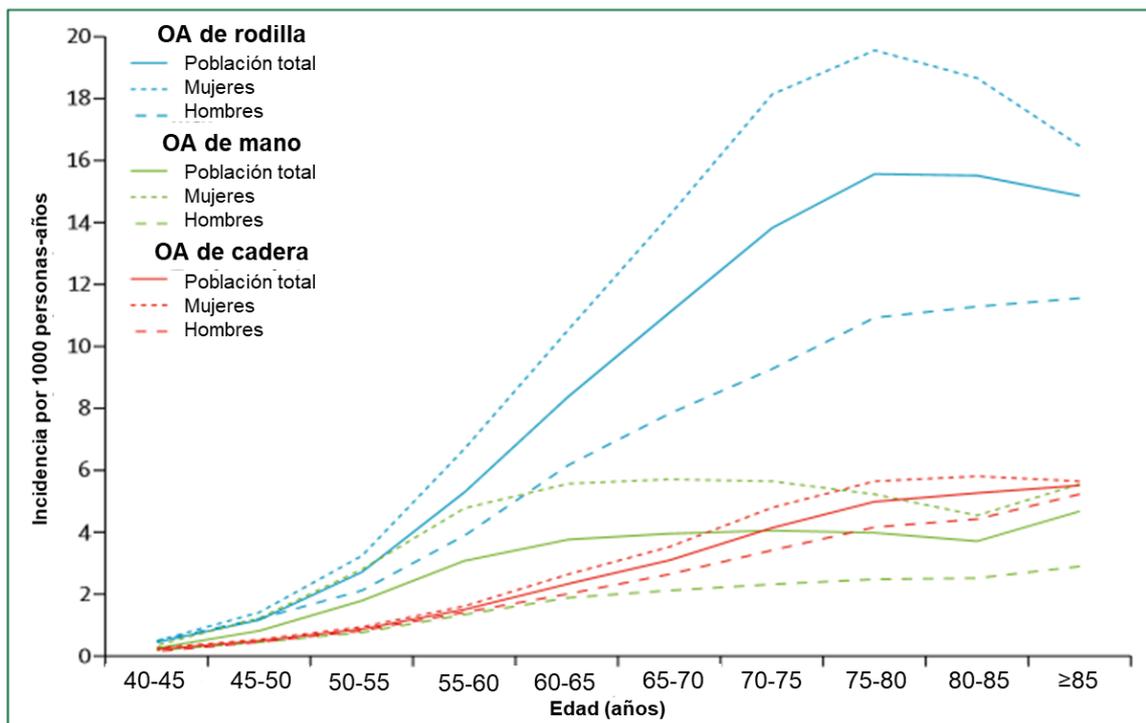


Figura 3. Ratios de incidencia estandarizados por edad y sexo de OA de rodilla (azul), cadera (rojo) y mano (verde) en toda la población (línea sólida), en mujeres (línea discontinua corta) y en hombres (línea discontinua larga). Extraída y modificada de (15).

2.4 Factores de riesgo

La OA es una enfermedad con múltiples factores de riesgo que actúan en conjunto promoviendo la aparición y/o progresión de OA (12). Pueden variar según la articulación afectada, la etapa y el desarrollo de la progresión de la enfermedad (4). Existen dos tipos: a nivel de persona y a nivel de articulación (figura 4; tabla 2) (12,28). El primer caso corresponde a los factores que actúan

a nivel sistémico en todas las articulaciones o son características propias del individuo en conjunto. Dentro de este grupo, se pueden dividir en modificables (obesidad, dieta y metabolismo óseo) o no modificables (edad, género, genética y raza) (28). Por otro lado, los factores a nivel de articulación hacen referencia a factores específicos locales y pueden ser únicos para una articulación en concreto (lesiones, actividad física, trabajo, alineamiento articular y fuerza muscular) (12,28).

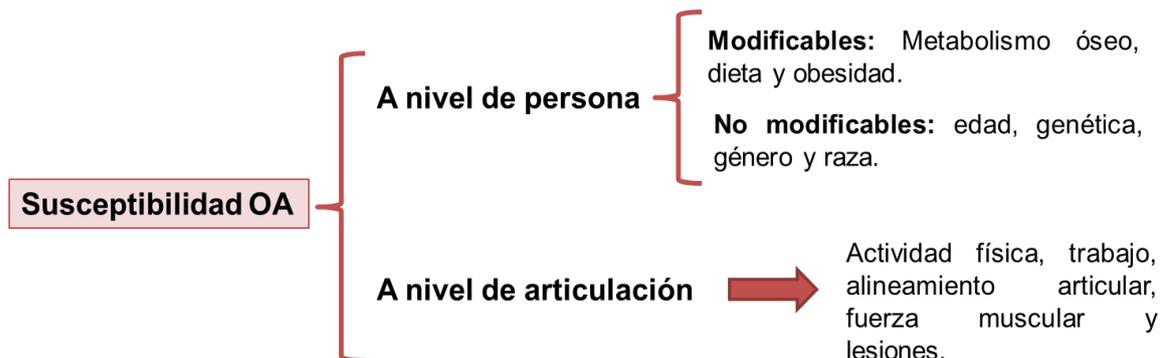


Figura 4. Esquema de los factores de riesgo de OA.

En la tabla 2 se detallan los factores de riesgo más importantes para la OA y sus características más destacables.

Tabla 2. Tipos de factores de riesgo, ejemplos y características (4,12,28).

Tipo	Factor de Riesgo	Características
A NIVEL DE PERSONA	Genética	<ul style="list-style-type: none"> • Heredabilidad: 30% en rodilla; 50% Cadera; 70% mano. • Gen <i>GDF5</i> (factor 5 de diferenciación y crecimiento) participa en el desarrollo, mantenimiento y reparación de las articulaciones sinoviales.
	Edad	<ul style="list-style-type: none"> • Factor de riesgo en todas las articulaciones. • Genera cambios en la capacidad del tejido articular para adaptarse a las modificaciones biomecánicas. • Incrementa la prevalencia e incidencia de OA en cada década de vida.
	Género	<ul style="list-style-type: none"> • Mujeres poseen mayor prevalencia de OA que los hombres. • Menopausia (disminución de los estrógenos) incrementa la prevalencia e incidencia de OA.
	Obesidad	<ul style="list-style-type: none"> • Potente factor de riesgo, especialmente en OA de rodilla y cadera. • Pérdida de peso disminuye el dolor y la incapacidad en pacientes con OA de rodilla. • Reducción de un 5% del peso está asociado con una mejor capacidad física. • Incidencia de OA de rodilla se incrementa con el aumento del IMC.
	Densidad mineral ósea (BMD)	<ul style="list-style-type: none"> • Asociada con el riesgo de incidencia de OA. • Contribuye a la reestructuración y masa ósea.
A NIVEL ARTICULAR	Lesiones mecánicas	<ul style="list-style-type: none"> • Prevalencia mayor de OA en pacientes con lesiones en el ligamento cruzado anterior y menisco. • 50% de pacientes con diagnóstico de ligamento cruzado anterior o menisco desarrollan OA tras 10-20 años. • Lesiones en la rodilla incrementan 4 veces el riesgo de desarrollar OA de rodilla.
	Actividad física y trabajo	<ul style="list-style-type: none"> • Uso repetitivo de la articulación predispone a desarrollar OA. • Trabajos que requieren arrodillarse o ponerse en cuclillas incrementan el riesgo de OA de rodilla.
	Fuerza muscular	<ul style="list-style-type: none"> • Debilidad muscular es común en pacientes con OA de rodilla. • Mejora a través del ejercicio y está asociada a la reducción de dolor en pacientes con OA de rodilla.
	Alineamiento articular	<ul style="list-style-type: none"> • Predictivo de progresión de OA de rodilla. • Mal alineamiento predispone a fuerzas mecánicas anormales.

2.5 Fisiopatología

La OA reduce drásticamente la calidad de vida del paciente (24). Su fisiopatología es compleja, pues integra aspectos mecánicos, biológicos, inflamatorios e inmunológicos (29).

La OA se inicia mediante cambios anormales del metabolismo de los tejidos articulares. A medida que continúa el proceso patológico, las alteraciones anatómicas y fisiológicas, tales como degradación del cartílago, remodelado óseo, formación de osteofitos, inflamación articular y pérdida de la función articular normal, se hacen presentes (19). Todo ello ocasiona la aparición de la dolencia (6).

Los tejidos principales involucrados en la patología de la artrosis son el cartílago, la membrana sinovial y el hueso subcondral (1,23). A continuación, se detalla la funcionalidad de los tres tejidos en la osteoartritis.

2.5.1 Cartílago articular

El cartílago articular es un tejido viscoelástico encargado de amortiguar y minimizar las fuerzas a las que son sometidas los huesos que forman una articulación. Este tejido carece de vascularización e inervación y está anclado al hueso subcondral (1).

La articulación normal es capaz de soportar presiones repetidas y localizadas, a través de la capacidad elástica y compresible del cartílago. Sin embargo, hay factores mecánicos que pueden favorecer la degradación del cartílago, pues inducen desgaste o alteraciones en la matriz extracelular. Existen dos formas de desgaste: el originado por la interacción entre dos superficies articulares y el causado por una deformación de la articulación debido a las continuas presiones repetitivas y cíclicas. En condiciones normales, los condrocitos son capaces de restaurar los defectos de la matriz extracelular, ya que mantienen un equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos de la MEC; pero si la acción mecánica continúa, el daño puede ser irreversible ocasionando la degeneración del cartílago articular de forma crónica (1). Además, conforme avanza la enfermedad, la reducción del número de

condrocitos en el cartílago articular no logra regenerar ni remodelar el cartílago de forma adecuada (30). Por otro lado, existen mediadores biológicos que también están involucrados en la destrucción del cartílago. Entre ellos podemos destacar las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, los factores de crecimiento, el óxido nítrico (NO), los mediadores lipídicos (prostaglandina E₂ y leucotrienos) y las adipocinas (1). El conjunto de mediadores biológicos liberados durante la artrosis es característico del fenotipo SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) y tiene la capacidad de activar a proenzimas proteolíticas del grupo de las proteasas, que intervienen en la degradación de la matriz extracelular y ocasionan, por tanto, la destrucción progresiva del cartílago (14,31).

2.5.2 Membrana sinovial

La membrana sinovial es una capa celular delgada que recubre la cavidad de la articulación y actúa como una membrana semipermeable para regular la transferencia de moléculas dentro y fuera de la articulación (6). Su aspecto es liso y brillante, aunque puede presentar vellosidades. También posee vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos (1). Sus principales funciones son lubricar y nutrir el cartílago avascular y regular la presión y temperatura local (23).

Los sinoviocitos son células indiferenciadas presentes en la membrana sinovial, localizadas en hilera entre las fibras de colágeno, las cuales forman parte del revestimiento interno de esta membrana (1). Estas células sintetizan lubricantes como el ácido hialurónico y la lubricina (23).

En la membrana sinovial de una articulación artrósica se desarrolla un componente inflamatorio que incide de forma importante en la patogenia y en el grado de manifestación clínica de la OA (1). Este componente inflamatorio, conocido como sinovitis o inflamación de la membrana sinovial, es debido a la hiperplasia e infiltración de células mononucleares (linfocitos T y B) (6) y se refleja en muchos signos y síntomas de la artrosis, como son enrojecimiento, hinchazón, calor y edema (1).

Durante el proceso inflamatorio, la membrana sinovial sintetiza mediadores bioquímicos que tienen un efecto catabólico sobre el cartílago. Estos

mediadores a su vez, estimulan la producción de moléculas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α y PGE-2) por parte de los condrocitos, provocando un efecto destructor de tejido articular OA (1). Además, los condrocitos activan proteinasas que generan productos de degradación que actúan como patrones moleculares asociados a daño (DAMP), los cuales interactúan con los receptores tipo Toll (TLRs, *toll-like receptors*), las proteínas integrinas y receptores para productos finales de glicación avanzada (RAGE). Esto provoca que los condrocitos aumenten aún más la expresión de productos inflamatorios y catabólicos (6,17).

2.5.3 Hueso subcondral

La estructura y composición ósea se adapta a lo largo de la vida, gracias a la actividad coordinada de los osteoblastos, que sintetizan hueso nuevo, y osteoclastos, que reabsorben el hueso, en respuesta a factores biomecánicos locales, hormonas sistémicas y mediadores solubles locales. El hueso subcondral, localizado debajo del cartílago articular, está organizado en una placa de hueso denso y una región contigua de hueso esponjoso (6).

En una articulación normal, el hueso subcondral absorbe un 30-50% de la carga recibida y el cartílago un 1-3%. En una articulación osteoartrítica, el hueso subcondral se esclerosa y disminuye su capacidad hasta el 30%, lo que supone una disipación de la carga hacia la articulación, especialmente al cartílago (1). También hay aumento en el volumen, el grosor y el contorno de la placa del hueso subcondral, alteraciones en el estado de mineralización ósea, cambios en la microarquitectura, formación de quistes óseos y osteofitos (excrecencias óseas que se localizan en los márgenes de las articulaciones). Estos cambios están mediados por alteraciones en la actividad de los osteoclastos y osteoblastos. Además, el hueso también puede sufrir daño físico directo, formándose microgrietas o fisuras dentro del hueso, debido al aumento de la carga mecánica (figura 5) (6).

En la figura 5 se representa un resumen de los principales cambios estructurales, mencionados anteriormente, que diferencian un tejido sano y uno artrósico.

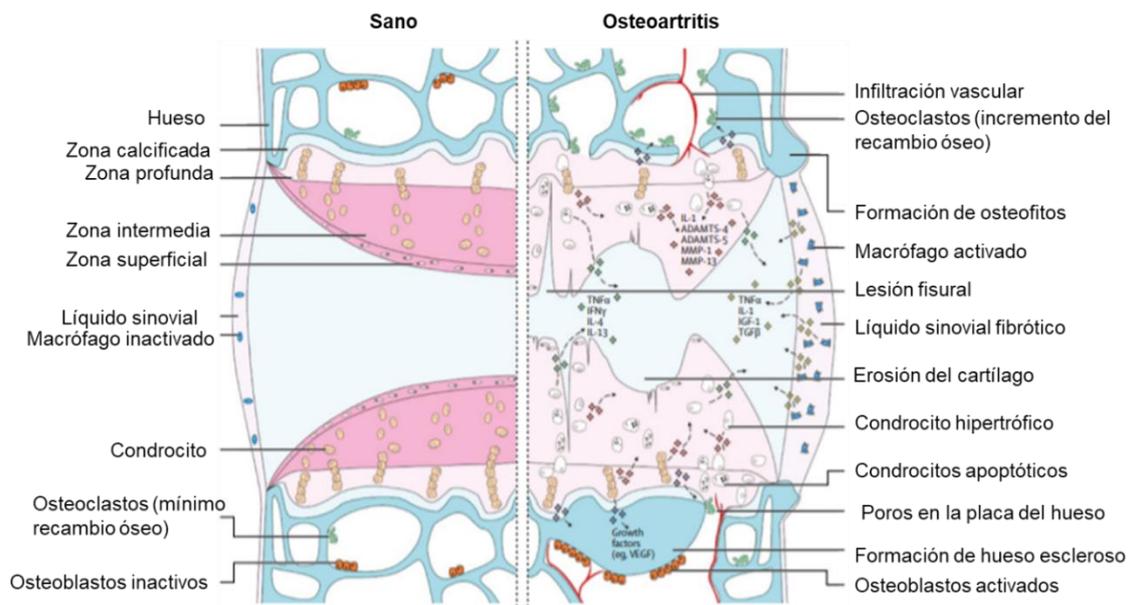


Figura 5. Cambios estructurales en el desarrollo de la osteoartritis. Modificada de (23).

2.6 Manifestaciones clínicas

La OA presenta manifestaciones clínicas muy variadas (2,15,29,32):

- El dolor es considerado el principal síntoma a la hora de la decisión clínica. En las primeras fases de la enfermedad, el dolor puede ser intermitente y autolimitado. Conforme avanza la OA, el dolor es más persistente, continuo, incapacitante e incluso puede adquirir carácter inflamatorio.
- La rigidez articular es otro síntoma importante en la artrosis. La rigidez suele durar 15-30 minutos y puede notarse mejoría con el ejercicio.
- Existen otros síntomas comunes en pacientes con OA, como el chasquido articular, reducción de la movilidad, hinchazón local y debilidad muscular.

2.7 Diagnóstico y evaluación

El diagnóstico clínico es el método estándar para confirmar la presencia de OA. Se basa en criterios sintomáticos (dolor, rigidez matinal y limitaciones funcionales) y un examen físico (crepitación, sensibilidad articular, movimiento restringido y agrandamiento óseo) establecidos y recomendados por *American*

College of Rheumatology of the European League Against Rheumatism for knee osteoarthritis (4,15). Además, también existe el criterio radiográfico, que es de gran utilidad a la hora del diagnóstico y confirmación de la artrosis, ya que puede aportar evidencia clara del estado de la articulación (estrechamiento del espacio articular, osteofitos, esclerosis, pseudoquistes, densidad del hueso subcondral y deformidad de los extremos óseos). Se utiliza el sistema de **clasificación de Kellgren-Lawrence** que permite calificar la OA en cinco niveles, de 0 a 4, según la gravedad de los elementos encontrados en la imagen radiográfica (tabla 3) (4,33). Esta clasificación puede tener problemas derivados de la subjetividad en la valoración de las imágenes radiológicas por parte del especialista.

Tabla 3. Clasificación de la OA según la escala de Kellgren-Lawrence. Extraída y modificada (33).

Grado	Hallazgos radiológicos
0 (normal)	<ul style="list-style-type: none"> ● Radiografía normal
1 (dudoso)	<ul style="list-style-type: none"> ● Dudoso estrechamiento del espacio articular ● Posible osteofitosis
2 (leve)	<ul style="list-style-type: none"> ● Posible estrechamiento del espacio articular ● Osteofitosis
3 (moderado)	<ul style="list-style-type: none"> ● Estrechamiento del espacio articular ● Moderada osteofitosis ● Esclerosis leve ● Posible deformidad de los extremos óseos
4 (severo)	<ul style="list-style-type: none"> ● Evidente estrechamiento del espacio articular ● Abundante osteofitosis ● Esclerosis severa ● Deformidad de los extremos óseos

Las mediciones de los cambios estructurales y el dolor deben complementarse con índices de limitación de actividad y restricción de participación. Existen cuestionarios estandarizados que están dirigidos a evaluar parámetros genéricos, como la salud general, la vitalidad y la salud mental o

discapacidades características de la enfermedad. Los cuestionarios específicos para evaluar la OA de la rodilla y la cadera son el WOMAC (*Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index*), el HOOS (*the Hip Disability and Osteoarthritis Outcome Score*) y el KOOS (*Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score*) (2). De todos ellos, el más utilizado es el cuestionario WOMAC, encargado de evaluar tres parámetros de la artrosis, el dolor, la rigidez y la capacidad funcional (figura 6). Cada parámetro recibe una puntuación de 0 a 4 puntos, siendo 0 la ausencia del síntoma y 4 la máxima intensidad del mismo. Si la puntuación total está entre 8 y 12 puntos nos indica una discapacidad severa (2,34).

Cuestionario WOMAC para artrosis					
Apartado A.					
Instrucciones: las siguientes preguntas tratan sobre cuánto DOLOR siente usted en las caderas y/o rodillas como consecuencia de su artrosis. Para cada situación indique cuánto DOLOR ha notado en los últimos 2 días .					
Pregunta: ¿Cuánto dolor tiene?					
1. Al andar por un terreno llano:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
2. Al subir o bajar escaleras:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
3. Por la noche en la cama:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
4. Al estar sentado o tumbado:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
5. Al estar de pie:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
Apartado B.					
Instrucciones: las siguientes preguntas sirven para conocer cuánta RIGIDEZ (no dolor) ha notado en sus caderas y/o rodillas en los últimos 2 días . RIGIDEZ es una sensación de dificultad inicial para mover con facilidad las articulaciones.					
1. ¿Cuánta rigidez nota después de despertar por la mañana?					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
2. ¿Cuánta rigidez nota durante el resto del día después de estar sentado, tumbado o descansado?					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
Apartado C.					
Instrucciones: las siguientes preguntas sirven para conocer su CAPACIDAD FUNCIONAL . Es decir, su capacidad para moverse, desplazarse o cuidar de sí mismo. Indique cuánta dificultad ha notado en los últimos 2 días al realizar cada una de las siguientes actividades, como consecuencia de su artrosis de cadera y/o rodilla .					
Pregunta: ¿Qué grado de dificultad tiene al...?					
1. Bajar escaleras:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
2. Subir las escaleras:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
3. Levantarse después de estar sentado:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
4. Estar de pie:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
5. Agacharse para coger algo del suelo:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
6. Andar por un terreno llano:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
7. Entrar y salir de un coche:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
8. Ir de compras:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
9. Ponerse las medias o los calcetines:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
10. Levantarse de la cama:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
11. Quitarse las medias o los calcetines:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
12. Estar tumbado en la cama:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
13. Entrar y salir de la ducha/bañera:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
14. Estar sentado:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
15. Sentarse y levantarse del retrete:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
16. Hacer tareas domésticas pesadas:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo
17. Hacer tareas domésticas ligeras:					
	Ninguno	Poco	Bastante	Mucho	Muchísimo

Figura 6. Cuestionario WOMAC para evaluar la OA de rodilla y cadera. Modificado de (2).

2.8 Pronóstico

La osteoartritis es considerada una enfermedad crónica, irreversible y progresiva, que suele evolucionar de manera no lineal. El deterioro funcional suele ir ligado al envejecimiento del individuo. Sin embargo, hay factores de riesgo modificables, como son el IMC y la inestabilidad articular, que favorecen la progresión de la artrosis (29).

2.9 Tratamiento

Hay tres tipos de tratamientos: no farmacológicos, farmacológicos y quirúrgicos (figura 7) (2,6). Sus principales objetivos son:

- Promover la educación sanitaria en los pacientes y familiares.
- Aliviar o controlar el dolor, síntoma principal de esta patología.
- Mejorar o mantener la funcionalidad de la articulación controlando la rigidez.
- Demorar la progresión del daño estructural.

Para establecer un tratamiento adecuado, los médicos tienen en cuenta el grado y la tasa de progresión de la artrosis, la edad, las comorbilidades asociadas, los costes y las necesidades y expectativas del paciente (11,29).

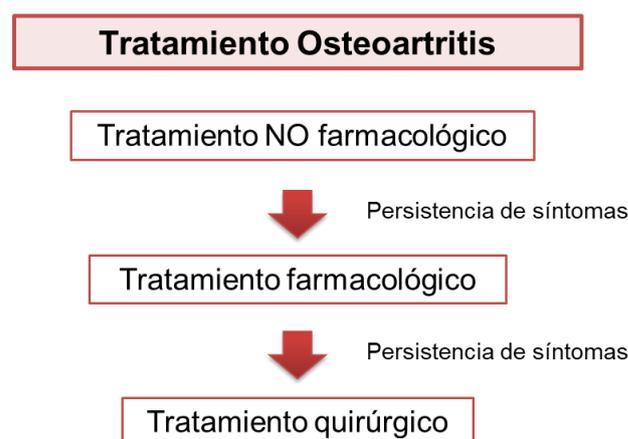


Figura 7. Procedimiento a seguir para el tratamiento de la osteoartritis.

2.9.1 Tratamiento no farmacológico.

La educación sanitaria juega un papel clave en las terapias no farmacológicas. Los pacientes deben ser informados sobre la naturaleza de la enfermedad, autocuidado, ejercicios adaptados y personalizados, programas de apoyo y nutrición (2,11,29). El ejercicio y el control o reducción de factores de riesgo, como el sobrepeso, son puntos importantes que mejoran la funcionalidad de las articulaciones y disminuyen el dolor (32).

El tratamiento no farmacológico es el eje central de la terapia y siempre debe mantenerse en los pacientes, ya que puede ayudar en la efectividad del resto de tratamientos (29).

2.9.2 Tratamiento farmacológico.

Dependiendo de los síntomas presentados por los pacientes, los tipos de fármacos utilizados son los siguientes:

- Los **analgésicos orales** son la primera línea de tratamiento. El analgésico más utilizado en pacientes con OA es el paracetamol o acetaminofén (29,32,34,35).
- Los **AINEs (antiinflamatorios no esteroideos)** tienen actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica y constituyen la segunda línea de tratamiento. Los más comunes son el ibuprofeno y el naproxeno (34,35).
- Si el dolor persiste, podemos optar por los opiáceos débiles (tramadol o codeína); y en los casos con dolor moderado-grave se utilizan opioides mayores (buprenorfina o fentanilo) (36).
- Los **fármacos condroprotectores** son conocidos como SYSADOA (*Symptomatic Slow Action Drugs OsteoArthritis*). Los más comunes son el condroitín sulfato, el ácido hialurónico y la glucosamina (37,38). Hay que destacar que el uso de este tipo de fármacos es controvertido, ya que su eficacia no está suficientemente probada (37).

2.9.3 Tratamiento quirúrgico

El tratamiento quirúrgico es el último recurso para paliar el dolor y mejorar las limitaciones de la realización de actividades cotidianas en pacientes con artrosis sintomática severa. Hay diferentes cirugías, tales como el lavado articular (eliminación de adherencias intraarticulares), la osteotomía (corrección de la alineación ósea) y la prótesis articular (reemplazo total o parcial). La realización de una cirugía u otra depende del grado de afectación, sintomatología y articulación dañada (2).

2.10 Prevención

Hay dos tipos de prevención: primaria y secundaria (6,21).

- **Prevención primaria.** Consiste en evitar factores de riesgo, antes de que los síntomas clínicos de la OA aparezcan.
 - o Control de peso. La obesidad es un factor de riesgo para la OA, de manera que el mantenimiento o reducción del peso a través de una adecuada dieta.
 - o Prevención en la actividad ocupacional. Evitar el uso repetitivo de la articulación y curar las heridas o traumatismos adecuadamente puede ayudar a prevenir la OA.
 - o Actividad física recomendada por el especialista. El incremento de la actividad física favorece el control de peso y puede ayudar a disminuir el riesgo de desarrollar artrosis.
 - o La alineación de las articulaciones, cadera y rodilla, mediante ortopedia, puede ayudar a reducir el riesgo de OA.
- **Prevención secundaria.** Se basa en ralentizar la progresión de la OA tras el diagnóstico. Su objetivo es mejorar la calidad de vida del paciente mediante programas de ayuda en casa, rehabilitación, tratamientos médicos...

3. Telómero

3.1 Definición y papel funcional

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas situadas en los extremos de los cromosomas lineales de las células eucariotas (39,40). En mamíferos, su ADN corresponde a una secuencia repetitiva en tándem 5'-TTAGGG/CCCTAA-3'; tiene un tamaño habitual de 10-15 Kb en las células humanas (40–43).

Muy cerca de las secuencias repetitivas de los telómeros, en dirección 5' hacia el centrómero, se localiza una región subtelomérica rica en islas CpG, cuyo grado de repeticiones de la secuencia 5'-TTAGGG/CCCTAA-3' es bastante menor. La región subtelomérica contiene el promotor de ARN telomérico, conocido como TERRA (*telomere repeat containing RNA*), y juega un papel importante en la formación de los complejos shelterina o telosoma (44–46).

Los telómeros protegen las zonas finales de los cromosomas, proporcionar estabilidad genómica y aseguran una correcta segregación del material genético entre las células hijas durante la división celular (42,43). Durante cada replicación del ADN y en ausencia de sistemas de reposición, el telómero se acorta un promedio de 50-150 bp, según el tipo celular (10,47). Las secuencias teloméricas actuarían como reloj biológico celular. Los telómeros son determinantes en el envejecimiento celular, al igual que de la entrada en senescencia o apoptosis de las células (42,43).

3.2 Estructura

3.2.1 ADN telomérico

Tal como se ha comentado, en eucariotas el ADN telomérico está compuesto por secuencias hexaméricas repetitivas, 5'-TTAGGG-3' en la cadena rica en guaninas (*G-rich strand*) y 3'-AATCCC-5' en la cadena rica en citosinas (*C-rich strand*) (42). La cadena rica en guanina del ADN telomérico presenta una cola monocatenaria sobresaliente, en 3', denominada cola G, de unos 30-400 nucleótidos. La región terminal de la secuencia telomérica se pliega hacia atrás, formando un bucle terminal (bucle T). El bucle se estabiliza gracias a la cola G, la cual invade la doble cadena, desplazando la cadena rica en guanina,

apareándose con la cadena complementaria rica en citosinas, formándose el bucle de desplazamiento (bucle D) (figura 8). Esta estructura peculiar, junto con los complejos proteicos asociados, precinta el extremo del telómero, protegiéndolo de la degradación, de las actividades de reparación del ADN y de la actividad de la telomerasa (43,48,49).

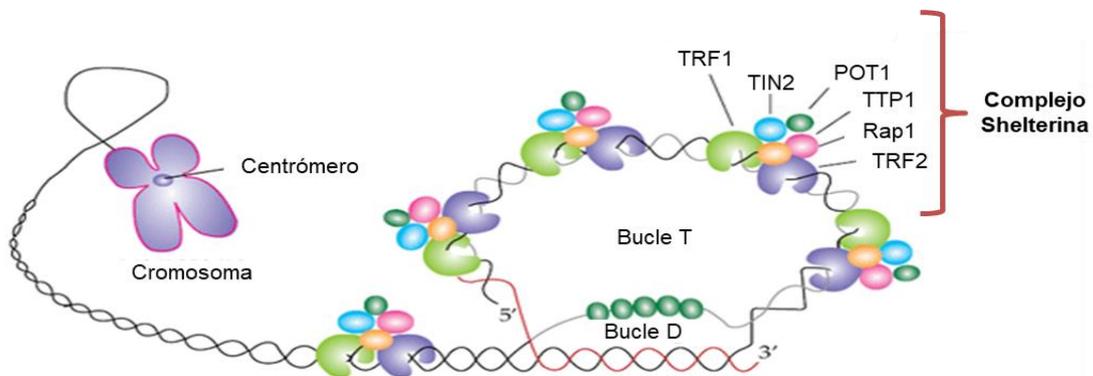


Figura 8. Representación de la estructura del telómero. Modificado de (50).

3.2.2 Componentes proteicos: complejo shelterina o telosoma

El proteoma del telómero consta de 200 proteínas. Ellas están asociadas con diferentes aspectos de la biología del telómero, incluyendo desde la protección y mantenimiento telomérico hasta la señalización y reparación del ADN dañado (49).

Las secuencias teloméricas están asociadas con un grupo de proteínas especializadas, conocido como complejo shelterina o telosoma, cuyas funciones son: regular la longitud telomérica mediante la interacción entre telómeros-telomerasa en la fase S del ciclo celular (49), impedir que el extremo de los cromosomas sea reconocido como rotura del ADN y reprimir las señales de la respuesta a daño del ADN (*DNA damage response*, DDR) (51).

El complejo shelterina está formado por seis proteínas en humanos: factor 1 y 2 de unión a las repeticiones teloméricas (*telomere repeat factors 1 and 2*, TRF1 y TRF2), proteína 1 represora/activadora humana (*repressor/activator protein 1*, hRAP1), proteína nuclear 2 de interacción con TRF1 (*TRF1-interacting nuclear protein 2*, TIN2), tripeptidilpeptidasa 1 (*tripeptidylpeptidase 1*, TPP1) y protector de los telómeros 1 (*protector of the telomeres 1*, POT1) (42,43,49).

Aparte del complejo shelterina, existe otro complejo proteico que contribuye en la regulación y mantenimiento del telómero, denominado complejo CST (*heterotrimeric protein complex*). Este complejo está formado por las proteínas CTC1 (*conserved telomere protection component 1*), TEN1 (*telomeric pathway with STN1*) y STN1 (*suppressor of cdc13a*). Se localiza en la cadena monohebra (cola G) del telómero y su función es interaccionar con la ADN polimerasa durante la replicación del telómero (51).

3.3 Histonas y sus modificaciones epigenéticas

Al igual que el resto del ADN cromosómico, el ADN telomérico también está asociado a histonas. La unidad básica de empaquetamiento del ADN es el nucleosoma, formado por 147 pares de bases de ADN unidos a un octámero de histonas (dos H2A, dos H2B, dos H3 y dos H4). El siguiente nucleosoma se encuentra a 80 pares de bases del primero, y así sucesivamente. El ADN se enrolla alrededor de los nucleosomas, los cuales se empaquetan para compactar el ADN. El grado de compactación va estar determinado por los niveles de metilaciones y acetilaciones en las histonas. De manera que la cromatina se puede mostrar en dos formas, heterocromatina (muy condensada) y eucromatina (poco condensada), que presentan diferentes niveles de transcripción y exposición a daños (41).

La heterocromatina constitutiva posee un alto grado de compactación del ADN y se localiza en regiones específicas, como son los centrómeros, regiones subteloméricas y telómeros. También, en ocasiones, este tipo de compactación se encuentra dispersa por los brazos de los cromosomas. Está caracterizada por la presencia de HP1 (proteína heterocromatina 1, *heterochromatin protein 1*). Los octámeros de histonas, es decir, los nucleosomas del telómero, poseen marcas epigenéticas propias de un estado compacto de la cromatina, tales como las hipermetilaciones H3K9met3 o H4K20met3 y residuos de lisina hipoacetilados (figura 9) (52–54).

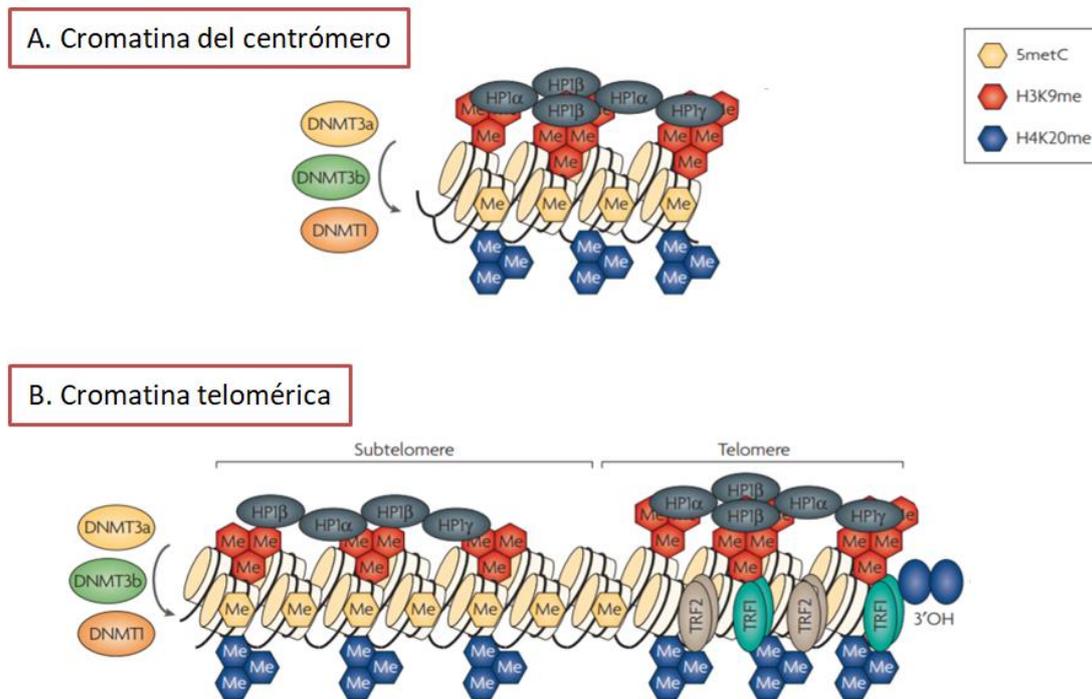


Figura 9. Modificaciones epigenéticas en la cromatina del centrómero (A) y telómero (B) de los cromosomas de los mamíferos. Me: metilación. HP1: proteína heterocromatina 1. DNMT: ADN metiltransferasa. TRF1 y TRF2: factor 1 y 2 de unión a las repeticiones teloméricas. Modificado de (54).

3.4 TERRA (*telomere repeat containing RNAs*)

Durante muchos años los telómeros se han considerado transcripcionalmente inertes. El descubrimiento de la transcripción de la cadena rica en citosinas de los telómeros por la ARN polimerasa II fue un importante avance en la biología del telómero (39,46).

TERRA es un ARN largo no codificante (LncRNA), cuya secuencia repetitiva es UUAGGG. Esta molécula de ARN es heterogénea en tamaño y varía desde 100 nucleótidos hasta 9 kb, exhibiendo una caperuza trimetilada en 5'. Además, puede ser poliadenilada en su extremo 3'. TERRA se localiza a lo largo de toda la estructura telomérica proporcionando una correcta conformación de los bucles (T y D), sellando la estructura cromatínica, facilitando la replicación de las repeticiones teloméricas y promoviendo la estabilidad cromosómica (55,56).

TERRA es transcrito por la ARN polimerasa II a partir de un promotor situado en la región subtelomérica y se asocia al ADN telomérico, dando lugar a híbridos de ADN:ARN llamados bucles R, cuyo rol principal es promover la recombinación homóloga directa en los telómeros (39,46,55,56).

Recientemente se ha encontrado que el ADN telomérico puede codificar proteínas, en particular en células que sufren disfunción o crisis telomérica. El transcrito TERRA podría traducirse por el mecanismo de traducción no ATG asociado a repetición (RAN), generando dos proteínas de repetición dipeptídica, valina-arginina (VR)_n y glicina-leucina (GL)_n. Estas podrían actuar como proteínas de señalización. Su abundancia podría alterar el metabolismo de los ácidos nucleicos y la síntesis general de proteínas y desencadenar respuestas de inflamación celular, con implicaciones en el cáncer y el envejecimiento (57).

3.5 Problema de la replicación terminal

El ADN telomérico se duplica a través de la replicación semiconservativa, pero no puede replicarse completamente. La enzima encargada del proceso de replicación es la ADN polimerasa que copia el ADN en dirección 5'-3' de forma directa. De tal forma que la cadena conductora se sintetiza de forma continuada, mientras que la cadena retardada requiere cebadores de ARN para su síntesis discontinua, ya que la ADN polimerasa solo puede continuar la síntesis pero no comenzarla. Tras su extensión, los cebadores de ARN se eliminan y los fragmentos de ADN (conocidos como fragmentos de Okazaki) se unen mediante una enzima ligasa. La eliminación del cebador más distal en el extremo 5' de la cadena retardada da lugar a la pérdida de dicha secuencia terminal (figura 10). Este mecanismo es conocido como el problema de la replicación terminal descrito por Olovnikov y por Watson. Sin embargo, esta replicación incompleta no es la única razón por la cual los telómeros se acortan. En el caso de la síntesis de la cadena conductora se origina una digestión nucleolítica para generar el extremo sobresaliente en 5' y permitir así la formación de la estructura final del telómero (figura 10) (42,43,58).

Esta problemática explica el por qué los telómeros se van acortando durante cada división celular, conociéndose como el reloj biológico de las células (42,43,58).

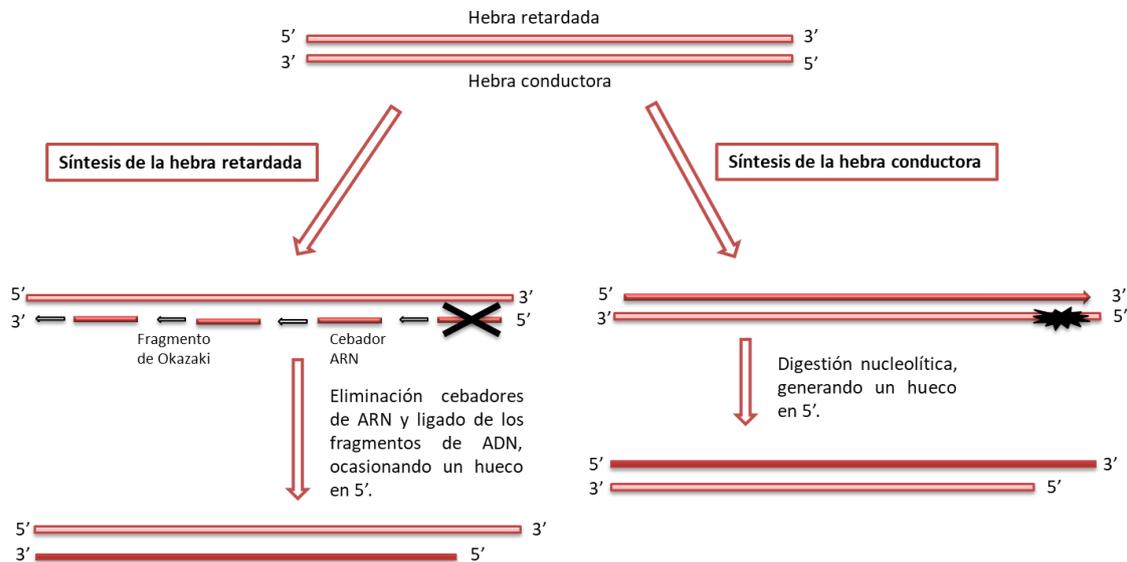


Figura 10. Esquema del problema de la replicación terminal del telómero. Modificado de (43).

Las células somáticas solo pueden experimentar un número definido de divisiones (límite de Hayflick) antes de que los telómeros se vuelvan extremadamente cortos y pierdan sus propiedades protectoras (39,59). Cuando las secuencias teloméricas se acortan críticamente o su arquitectura de la cromatina de orden superior se ve comprometida, los telómeros pierden su función de protección y desencadenan una respuesta de daño del ADN (DDR) mediada por la vía de las kinasas ATM/ATR. Esto conduce a la senescencia replicativa que opera como mecanismo supresor de tumores, provocando que las células dejen de dividirse o mueran por apoptosis (54,60,61).

En el caso de las células germinales, la longitud telomérica se mantiene gracias a la acción de la enzima telomerasa. Algo similar pasa con las células cancerosas, ya que encuentran la manera de alargar las secuencias teloméricas por medio de la activación de la enzima telomerasa o el sistema de recombinación, lo cual es necesario para el proceso de inmortalización (39,62).

3.6 Telomerasa y ALT

La telomerasa es una ribonucleoproteína con actividad transcriptasa inversa (39), encargada de la adición de ADN telomérico de *ново* para compensar la erosión telomérica causada en cada división celular (42,43). La expresión de la telomerasa está restringida a los estados tempranos del desarrollo embrionario (células madre embrionarias pluripotenciales y compartimentos de células madre adultas). Aunque la telomerasa se expresa en compartimentos de células madre adultas, esto no es suficiente para contrarrestar la pérdida de telómero asociada en cada división celular. Por ello, los telómeros se van acortando con la edad tanto *in vitro* como *in vivo* (43).

Como se puede ver en la figura 11, en humanos la enzima telomerasa está formada por una subunidad catalítica con actividad transcriptasa inversa (TERT), un componente que actúa como molde de ARN (TERC) y una serie de proteínas específicas (51,63,64), que interactúan con TERC y regulan la biogénesis, la localización subcelular y la actividad funcional de la telomerasa. El 85-90% de los tumores activan la telomerasa para mantener un potencial replicativo ilimitado (42,51).

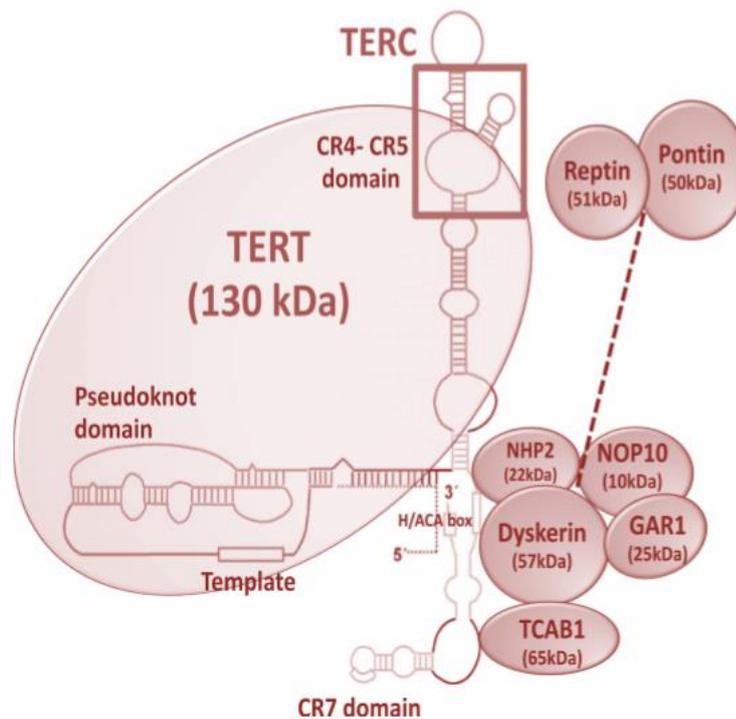


Figura 11. Estructura de la telomerasa. La telomerasa está compuesta por TERT (subunidad catalítica), TERC (molde de ARN), disquerina y otras proteínas asociadas (GAR1, TCAB1, NHP2, NOP10, disquerina o DCK1) (51).

Alrededor del 10-15% de los tumores cancerosos de mamíferos y líneas celulares inmortalizadas, los telómeros se extienden de forma independiente a la telomerasa, mediante el proceso conocido como ALT o alargamiento alternativo de los telómeros (*alternative lengthening of telomeres*) (39,51). Los osteosarcomas, los leiomiomas, los astrocitomas de grado 2 y 3, y los tumores pancreáticos neuroendocrinos usan esta estrategia para el mantenimiento de los telómeros. Las células que emplean el mecanismo ALT tienen longitudes teloméricas altamente heterogéneas y abundante ADN telomérico extracromosómico. El sistema ALT está basado en un mecanismo de recombinación homóloga (figura 12) aunque de un modo más desorganizado y heterogéneo (42,63).

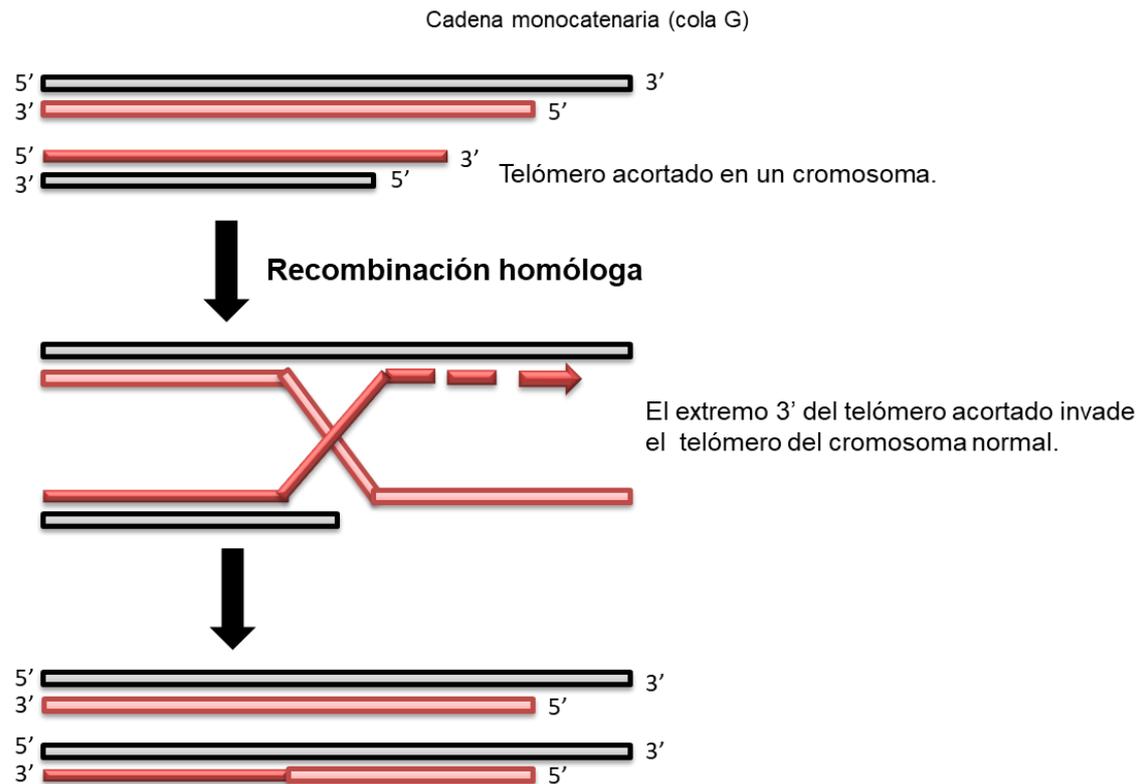


Figura 12. Alargamiento alternativo de los telómeros (ALT). Modificado de (51).

Los telómeros en las células con ALT se agrupan alrededor de cuerpos nucleares de leucemia promielocítica (PML), denominados cuerpos PML asociados a ALT (APB) (53).

3.7 Envejecimiento asociado al telómero

El envejecimiento se define como un proceso natural (65) y multifactorial, resultado de un declive progresivo funcional (43). Según las Naciones Unidas, la proporción de personas mayores de 65 años se duplicará en los próximos 30 años, lo que significa que este grupo demográfico representará más de 16% de la población mundial para 2050 con respecto al 9% que representa en la actualidad (66).

Una de las rutas moleculares identificadas como posible causa de envejecimiento es el acortamiento telomérico (43), cuyo inductor principal podría ser el estrés oxidativo (67), el cual aumenta conforme lo hace el envejecimiento

y, por tanto, parece tener importancia en las enfermedades relacionadas con la edad (39), como es el caso de la artrosis.

Individuos con la misma edad muestran variaciones en la longitud del telómero, debido a la influencia de factores genéticos y ambientales (43,60). El tamaño del telómero tiene una heredabilidad estimada de 36-84% (60,68). Sin embargo, existe la evidencia que los factores estresantes medioambientales, e incluso las adversidades psicosociales, principalmente en niños, pueden acelerar el acortamiento del telómero (60,69). Esta influencia podría ser mediada por la proliferación acelerada del tejido y/o el estrés oxidativo. El incremento de las especies reactivas de oxígeno daña el ADN, siendo especialmente sensibles las secuencias ricas en guaninas, como son los telómeros, muy propensos a daño oxidativo y escisión (60,70).

La interacción entre los factores genéticos y externos sobre el mantenimiento del telómero podría determinar la longitud telomérica individual y, por tanto, la expectativa de vida y susceptibilidad para desarrollar enfermedades relacionadas con la edad (43).

Aunque no hay una clara relación evidente entre la senescencia replicativa *in vitro* y el envejecimiento del organismo, está claro que la longitud del telómero disminuye con la edad y está siendo considerada un biomarcador de la edad biológica. Numerosos estudios, incluido uno con más de 64000 individuos, sugiere que la presencia de telómeros cortos en leucocitos o saliva se correlaciona con disminución de la vida media (60,71,72). Muchos de esos estudios no se han realizado a lo largo de la vida de esos individuos mediante el análisis de muestras repetidas a lo largo del tiempo, por lo que es difícil separar las influencias a nivel individual o poblacional. Algunas encuestas poblacionales indican que la pérdida de los telómeros es mayor durante los primeros años de vida (60,73). Heidinger *et al.* monitorizaron la longitud del telómero en células del pájaro diamante cebra (*Taeniopygia guttata*) y observaron que la longitud de los telómeros en la vida temprana, es decir, al final del periodo de crecimiento (sobre unos 25 días), era un predictor muy fuerte de la longevidad (60,74).

Además, diversos metaanálisis correlacionaron la disminución del tamaño del telómero con algunas enfermedades relacionadas con la edad. Por ejemplo, los individuos con telómeros cortos en leucocitos de sangre periférica tienen un

80% más de riesgo de enfermedad cardiovascular y un 40% de desarrollar esta enfermedad en el futuro (60,75). El riesgo también es evidente en la diabetes y numerosos cánceres (60,76–78). Un estudio de cohortes de asociación del genoma completo (GWAS) indica que las variantes de secuencia comunes en siete genes implicados en la regulación de los telómeros aumentan el riesgo cardiovascular, pulmonar y la enfermedad de Alzheimer (60,79,80). En cuanto a la reproducción humana, un estudio reveló que 25 parejas con pérdida recurrente de embarazo presentaban una longitud más corta de los telómeros en leucocitos en comparación con 20 parejas fértiles (60,81).

La importancia de los telómeros en el envejecimiento está demostrada mediante modelos murinos con acortamiento o alargamiento de estas secuencias que presentan una disminución o un aumento de vida, respectivamente (82,83). Además, algunos estudios han encontrado relación entre el acortamiento de los telómeros y un incremento del riesgo de mortalidad en humanos (84,85).

Por otro lado, el acortamiento telomérico ha sido descrito en múltiples enfermedades, tales como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la osteoporosis y la artrosis (86).

3.8 Leucocitos de sangre periférica como biomarcador de la longitud-tamaño del telómero

Existe la necesidad de medir la edad biológica para poder distinguir entre un envejecimiento saludable y normal, de un envejecimiento prematuro o acelerado que podría ser factor de riesgo de múltiples patologías, como pueden ser las enfermedades relacionadas con la edad (41,87).

El acortamiento telomérico parece mostrarse como una medida de edad biológica y un potencial indicador predictivo de la esperanza de vida en poblaciones humanas. La medición de la longitud de los telómeros en células de sangre periférica está correlacionada con el acortamiento del telómero experimentado en tejidos somáticos del mismo sujeto, lo que permitió su consideración como biomarcador de envejecimiento (72,88,89). La

determinación de los telómeros en leucocitos de sangre periférica (*peripheral blood leukocytes*, PBL) podría ser un potencial biomarcador con información sobre el estado de los telómeros en tejidos menos accesibles (90,91).

El tipo de muestra más frecuente para la estimación relativa de la longitud-tamaño del telómero son los leucocitos de sangre periférica, ya que este tipo de muestra puede tomarse repetidamente al paciente con un daño mínimo. De ahí que sea un biomarcador no invasivo para el individuo. Concretamente, en enfermedades relacionadas con la edad, como pueden ser las enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, diabetes tipo II y la demencia, la disminución del tamaño de los telómeros en PBL se muestra correlacionada con un mayor riesgo de dichas patologías (92–95).

3.9 Telómeros y artrosis, en condrocitos y en leucocitos de sangre periférica

El acortamiento de los telómeros está involucrado en la patogenia de las enfermedades relacionadas con la edad, entre las cuales la osteoartritis es una de las más comunes (96). La erosión del telómero y los indicadores de senescencia celular aumentan con la edad en el cartílago articular y estos cambios parecen amplificarse en el cartílago osteoartrotico (97).

Los telómeros se acortan 50-150 pb durante cada replicación del ADN. La telomerasa se encarga de sintetizar nuevas repeticiones teloméricas para mantener el ADN telomérico (98). Sin embargo, la telomerasa no es activa en muchas células somáticas, como los condrocitos. Por ello, la longitud de los telómeros en condrocitos disminuye con la edad, lo cual también se ha demostrado en cultivos celulares *in vitro* (99,100). El desgaste de los telómeros en condrocitos con OA podría ser consecuencia del aumento de las divisiones celulares o recambio y/o daño en el ADN telomérico. Los condrocitos se consideran esencialmente células que no se dividen, por lo que el acortamiento telomérico en OA sería principalmente debido a daño inducido en dichas secuencias. Quizás la disminución de los telómeros relacionada con la historia replicativa debería ser más notable durante la producción y maduración del cartílago y volverse menos significativa en el recambio celular posterior. Es

posible que los condrocitos con OA tengan una tasa de renovación más alta que los sanos, para compensar la muerte celular apoptótica involucrada en esta enfermedad degenerativa que progresa durante décadas. De hecho, en la OA se observan clásicamente grupos de condrocitos posiblemente derivados de la división celular mitótica (101,102) y se ha observado cierta división celular en la etapa posterior de la OA (103).

Al contrario que los condrocitos, los leucocitos, en general, presentan una alta tasa de recambio, ya que la vida media de los granulocitos es de unos pocos días. Ello supone una elevada actividad mitótica de las células madre hematopoyéticas, lo cual debería traducirse en una tasa de acortamiento telomérico mayor que la de los condrocitos, con la edad. Aunque estas células madre poseen cierta actividad telomerasa, esta es insuficiente para prevenir el acortamiento telomérico (97,98).

La longitud telomérica ha sido comparada en condrocitos humanos y en leucocitos de sangre periférica. El estudio realizado por Tamayo *et al.* (98) no encontró diferencias significativas entre la longitud del telómero de PBL ($p=0,12$) y de condrocitos ($p=0,08$) en pacientes con OA de rodilla y cadera, aunque la longitud de los telómeros en condrocitos era mayor que en leucocitos. Además, tampoco se encontraron diferencias significativas cuando se comparó la longitud media de los telómeros de PBL en pacientes con OA con los controles ($p=0,11$).

La comparación de la longitud de los telómeros de leucocitos en pacientes con OA respecto a controles sanos es controvertida. Xie *et al.* (104) estableció diferencias significativas en la longitud de los telómeros de pacientes con OA ($p=0,014$). También existen numerosos estudios que relacionan el tamaño de los telómeros con la OA en regiones específicas. Por ejemplo, Zhai *et al.* (105), encontró diferencias significativas en el tamaño de los telómeros de pacientes con OA de mano ($p=0,04$), al igual que Poonpet *et al.* (48) y Mosquera *et al.* (10) en pacientes con OA de rodilla, $p=0,039$ y $p<0,001$, respectivamente. También McAlindon *et al.* (97) estableció una fuerte asociación del tamaño de los telómeros de leucocitos de pacientes con OA de mano incidente. Sin embargo, un estudio no encontró diferencias significativas de acortamiento telomérico en pacientes con OA de rodilla ($p=0,234$) (47).

Hay que destacar que todos estos estudios son estáticos, en un punto temporal. Pero es importante tener en cuenta que el telómero es dinámico y la cantidad de las secuencias teloméricas va decreciendo con el tiempo.

Actualmente, el diagnóstico de la artrosis se basa principalmente en estudios radiográficos, que detectan estadios tardíos de esta enfermedad. Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el inicio y la progresión de la osteoartritis puede mostrar nuevas direcciones en el diagnóstico precoz y nuevos métodos de tratamiento de esta patología extremadamente común. La identificación de nuevos biomarcadores tempranos para la osteoartritis puede permitir ralentizar la progresión de la osteoartritis y ayudar a predecir los resultados de la osteoartritis en pacientes específicos. La longitud de los telómeros y el acortamiento de los telómeros en leucocitos y condrocitos podrían convertirse en biomarcadores tempranos de la osteoartritis; sin embargo, para sacar conclusiones fiables, es necesario realizar el análisis de grupos más grandes y homogéneos. Hasta ahora, la mayoría de los estudios de telómeros se realizaron en pequeños grupos de pacientes, frecuentemente con osteoartritis de rodilla o cadera. Se deben realizar más estudios para comprender mejor el efecto del acortamiento de los telómeros sobre el envejecimiento del cartílago (96).

Por todo ello, el acortamiento telomérico conforme aumenta la edad tiene gran atractivo e interés en los últimos años (39), ya que los telómeros podrían servir como un marcador biológico del envejecimiento y, por tanto, actuar como diagnóstico de muchas enfermedades relacionadas con la edad, con un alto potencial pronóstico (43,65), como podría ser el caso de la artrosis.

4. Haplogrupos del ADN mitocondrial

4.1 Generalidades de la mitocondria

La mitocondria es el orgánulo celular presente en todas las células eucariotas, cuya función principal es la producción de energía a través del proceso de la fosforilación oxidativa (OXPHOS, *Oxidative phosphorylation*) (106–108).

Según la teoría de endosimbiosis, la mitocondria surgió hace 1,5 millones de años con la fusión de una α -proteobacteria capaz de obtener energía del oxígeno (cadena respiratoria/fosforilación oxidativa) con la célula eucariota primitiva (106,109).

La cantidad de mitocondrias es proporcional a la demanda energética de cada tejido. El volumen total de mitocondrias es de un 20-40% de volumen total de la célula. Habitualmente su forma suele ser cilíndrica alargada, con un diámetro en torno a 0,5-1 μ m y una longitud de 10 μ m (106).

La mitocondria está formada por (figura 13) (106,110):

- La **membrana mitocondrial externa (MME)** es lisa, poco densa y altamente permeable para moléculas de hasta 10 kDa gracias a las porinas mitocondriales.
- La **membrana mitocondrial interna (MMI)** forma una especie de pliegues, conocidos como crestas mitocondriales, donde se sitúan los complejos de la cadena de transporte electrónico (CTE). Esta membrana permite el paso de dos tipos de moléculas: neutras de tamaño inferior a 150 Da (O_2 , CO_2 y H_2O) e iones pequeños (H^+ , K^+ , Na^+ y Cl^-).
- El **espacio intermembrana** se sitúa entre las dos membranas y es importante en el proceso de producción de ATP (adenosín trifosfato, *adenosine triphosphate*), ya que es el lugar donde se acumula una gran concentración de protones.
- La **matriz mitocondrial** es el espacio limitado por la MMI y contiene una gran cantidad de enzimas encargadas del metabolismo mitocondrial, como las relacionadas con el ciclo de Krebs y la β -oxidación de ácidos grasos. En esta zona, también se encuentra presente el ADN mitocondrial

(ADNmt), los ribosomas y los diferentes componentes de la maquinaria de replicación y traducción del material genético mitocondrial.

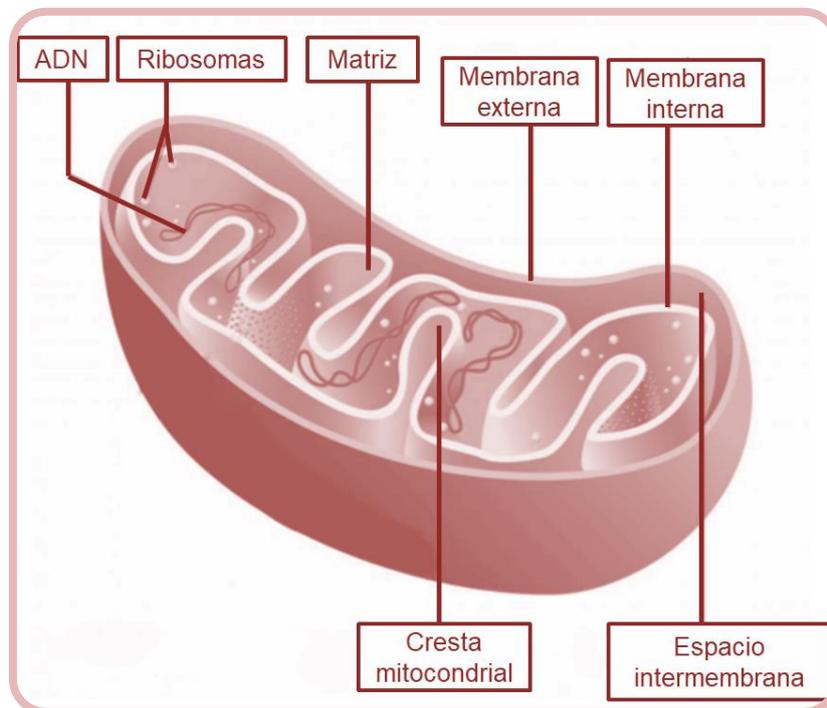


Figura 13. Estructura de la mitocondria. Modificado de (106).

Como hemos mencionado, la principal función de la mitocondria es la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa, cuyo mecanismo se puede resumir en tres pasos. El primero se basa en el metabolismo oxidativo de sustratos tales como la glucosa, los aminoácidos y los ácidos grasos mediante los procesos de glucólisis, desaminación oxidativa y β -oxidación, respectivamente, para dar lugar a moléculas de acetil-CoA. El segundo paso es la incorporación de dos carbonos del acetil-CoA al ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarboxílicos) para oxidarse y generar energía que se libera en forma de guanosín trifosfato (GTP) y poder reductor (NADH y FADH_2). En el último paso, el poder reductor generado se utiliza para la síntesis de ATP en la mitocondria a través de la OXPHOS. El ATP que se produce durante este proceso representa cerca del 90% de la energía total obtenida (106,111).

El sistema OXPHOS está compuesto por dos subunidades: CTE con los complejos I-IV y la ATP sintasa o complejo V. Los complejos enzimáticos situados en la CTE están orientados de forma específica en la MMI. El trasvase de electrones en estos complejos, libera energía que es almacenada en forma de gradiente de protones. Estos electrones proceden del metabolismo oxidativo de los sustratos descritos anteriormente. La energía liberada por el movimiento de los electrones en la CTE es utilizada para bombear protones fuera de la matriz mitocondrial. La energía potencialmente almacenada se utiliza para activar el complejo V (ATP sintasa) que se encarga de formar ATP a partir de ADP (adenosín difosfato) más Pi (fosfato inorgánico). El ATP generado se transporta al citosol mediante un transportador de nucleótidos de adenina, que retorna ADP del citosol (112).

El sistema OXPHOS se regula tanto por el ADN nuclear como por el ADN mitocondrial, siendo el genoma nuclear el que codifica la mayoría de subunidades de los distintos complejos (112).

Por otro lado, la fosforilación oxidativa es una de las principales fuentes de generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Se estima que un 2-3% del oxígeno molecular consumido durante el proceso de OXPHOS sufre una reducción incompleta dando lugar a la especie reactiva anión superóxido (O_2^-) en lugar de agua (113). La producción de ROS se contrarresta con un sistema de defensa antioxidante con enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx). La SOD convierte el O_2^- en H_2O_2 , mientras que la catalasa y la GPx convierten el H_2O_2 en H_2O . El equilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes determina el grado de estrés oxidativo. Las consecuencias celulares y moleculares del estrés oxidativo incluyen la apoptosis y el daño en el ADN y las membranas, es decir, en procesos relacionados con el envejecimiento (106,112).

Los condrocitos obtienen entre un 10-25% de la energía mediante el proceso de OXPHOS. A pesar de no ser el principal proceso de obtención de energía, la mitocondria puede tener un papel relevante en la aparición y/o progresión de la OA (106).

4.2 Genoma mitocondrial

La mitocondria tiene su propio material genético, el ADNmt, molécula circular de doble cadena de 16569 pares de bases (pb) que codifica 22 ARNt (ARN transferente), 2 ARNr (ARN ribosómicos) y 13 proteínas de la cadena de transporte electrónico. Dentro de estas últimas, encontramos 7 proteínas del complejo I (NADH deshidrogenasa): ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6; 1 proteína del complejo III (citocromo b oxido-reductasa, Cyt b); 3 proteínas del complejo IV (citocromo C oxidasa): COI, COII y COIII; y 2 proteínas del complejo V (ATP sintetasa): ATPasa 6 y ATPasa 8 (figura 14) (106,114–116).

Las mitocondrias son heredadas de la célula germinal femenina en humanos (116).

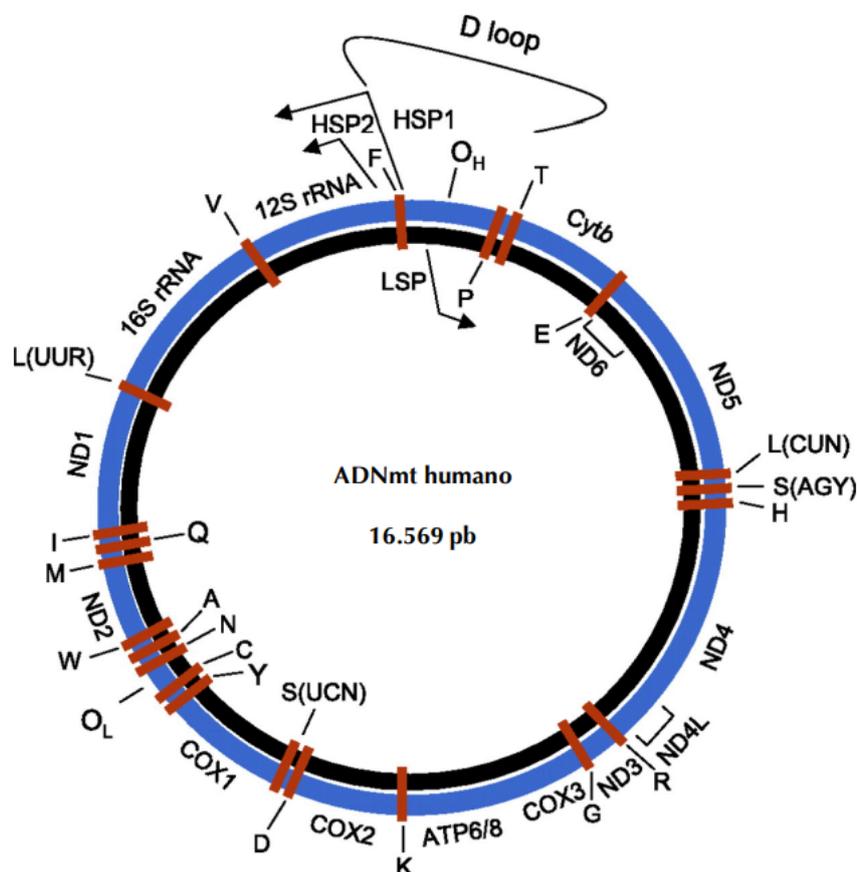


Figura 14. Representación esquemática del genoma mitocondrial humano. Extraído de (112).

El ADNmt tiene una zona no codificante conocida como región *D-loop* (*displacemente-loop*) o región control, cuya función es regular la replicación y transcripción del ADNmt pues en ella encontramos el origen de replicación y regiones promotoras de la transcripción. Esta zona tiene una tasa de mutación 10 veces superior que el resto del genoma mitocondrial (106). De igual forma, las mutaciones son más frecuentes en el ADNmt que el ADN nuclear debido a su proximidad a la fuente principal de producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno, la falta de un sistema de reparación eficiente y la alta tasa de replicación del ADN (115). Cada mitocondria suele contener varias copias de ADNmt en la matriz, estimándose unas 2-10 copias en función del tipo celular y las necesidades energéticas del tejido (106).

4.3 Generalidades y origen de los haplogrupos mitocondriales.

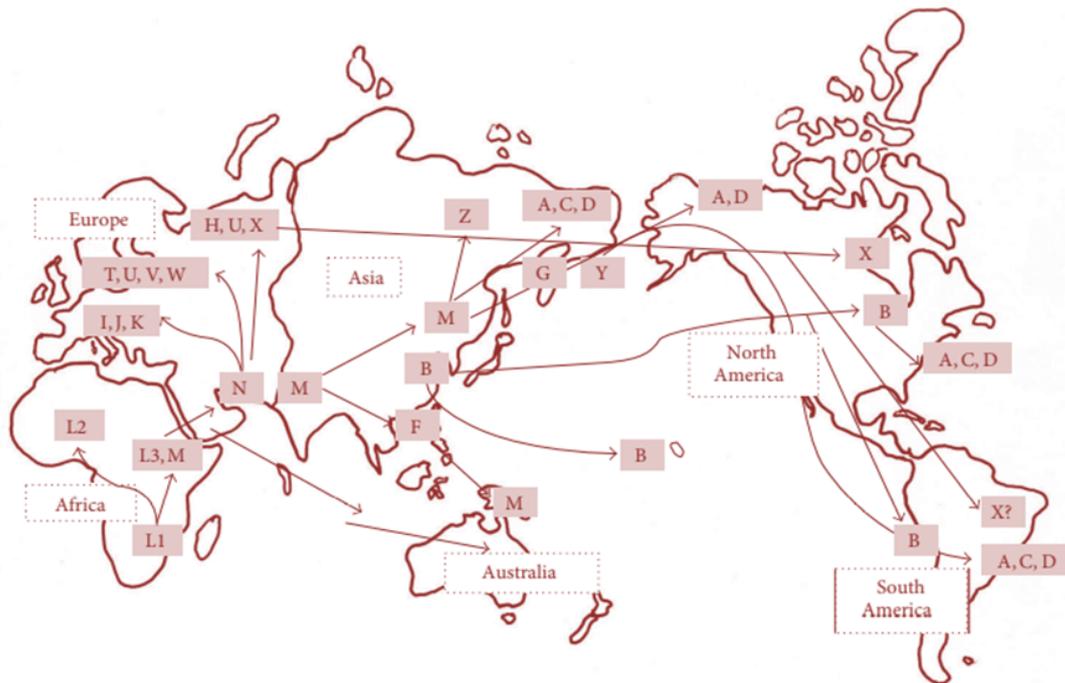
Los haplogrupos de ADNmt son un conjunto asociado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (tabla 4) (106). Estas mutaciones fueron adquiridas a lo largo de la historia evolutiva y modeladas por el ambiente (18). Su origen se remonta a 200.000 años en África con un ancestro común conocido como Eva mitocondrial, cuyos descendientes (raza humana) migraron al resto de territorios continentales, suponiendo la generación de nuevas mutaciones que han dado lugar a los haplogrupos mitocondriales, los cuales tienen tendencia a estar asociados geográficamente con una región o zona concreta (figura 15) (106,116,117).

Tabla 4. Sitios polimórficos del ADNmt utilizados para asignar los principales haplogrupos mitocondriales europeos (118).

Haplogrupo	Sitios Polimórficos					
	7025	14766	10394	4577	12308	4216
H	C	C	A	G	A	T
V	T	C	A	A	A	T
K	T	T	G	G	G	T
U	T	T	A	G	G	T
T	T	T	A	G	A	C
J	T	T	G	G	A	C

El árbol filogenético tiene tres ramas principales (116):

- Los **haplogrupos mitocondriales africanos** se distribuyen en siete familias: L0, L1, L2, L3, L4, L5 y L6. La familia L3 se subdividió hace 85.000 años en M, N y R.
- Los **haplogrupos mitocondriales asiáticos** aparecieron hace 60.000 años a partir de los subtipos M, N y R, los cuales originaron los subtipos americanos.
- Los **haplogrupos mitocondriales europeos** aparecieron hace 45.000 años a partir de los subtipos N y R. Los haplogrupos principales son H, HV, U, T, J, W, X e I.



Figuras 15. Mapa distributivo de los principales haplogrupos mitocondriales (116).

Cada uno de los haplogrupos influye en el comportamiento de las mitocondrias e interactúan con el genoma nuclear. Algunas de estas variantes genéticas se han relacionado con enfermedades degenerativas y metabólicas e incluso se ha asociado con el aumento de la longevidad en humanos (18).

4.4 Importancia de los grupos mitocondriales en la artrosis

La mitocondria y su genoma parecen tener un papel clave en el proceso de la artrosis. Numerosos estudios han descrito la utilidad de los haplogrupos del ADNmt como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de la OA (119,120).

Los portadores del haplogrupo mitocondrial J muestran un menor riesgo de padecer artrosis de rodilla y, en caso de sufrir la enfermedad, la gravedad de la misma suele ser menor (119). El efecto protector de este haplogrupo se extiende también a pacientes con artrosis de cadera (121) y con afectación en ambas articulaciones (rodilla y cadera) (18,106). También se ha constatado en una cohorte española, que el clúster (agrupación de haplogrupos de ADNmt) JT presenta una progresión radiológica más lenta, mientras que el haplogrupo H

tiene mayor riesgo de someterse a una operación de reemplazo articular (122). Otro estudio de una cohorte americana de la *Osteoarthritis Initiative* (OAI) estableció que los pacientes con el haplogrupo T tenían una tasa de progresión menor tanto a nivel radiológico como clínico (18,122,123).

Los distintos haplogrupos mitocondriales pueden modular el metabolismo mitocondrial; es decir, el nivel de funcionamiento del complejo OXPHOS varía entre los haplogrupos. Hay ciertos haplogrupos, como es el caso del haplogrupo J, que parecen tener un mejor consumo de oxígeno, lo que se traduce en un menor daño oxidativo. Un estudio demostró que los portadores del haplogrupo J presentaban un menor acortamiento de los telómeros y producción de NO en condrocitos articulares. Esto pone de manifiesto la estrecha relación de la acción oxidante de ROS y las especies reactivas de nitrógeno, el envejecimiento celular y el acortamiento del telómero (106,123). Además, otros estudios han descrito la utilidad de los haplogrupos del ADNmt como biomarcadores de incidencia y pronóstico de la OA (18,119,122); de ahí la importancia de poder establecer una posible relación entre el haplogrupo de ADN mitocondrial y la pérdida de las secuencias teloméricas en la incidencia de la OA de rodilla.

OBJETIVOS

Objetivo 1. Evaluar la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas en muestras de leucocitos de sangre periférica, con el fin de predecir la prevalencia y la incidencia de OA en rodilla.

- ¿Es diferente el nivel de pérdida de secuencias teloméricas de leucocitos en individuos que ya padecen OA de rodilla (prevalencia) y en los que desarrollan OA de rodilla durante los 72 meses (incidencia)?
- ¿Es la pérdida de las secuencias teloméricas un factor de riesgo independiente asociado a la prevalencia y/o incidencia de OA de rodilla?
- ¿Hay otros factores, a parte de la pérdida de las secuencias teloméricas, que afectan al desarrollo y/o aparición de OA de rodilla?

Objetivo 2. Evaluar la relación del haplogrupo de ADN mitocondrial y la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas como biomarcadores de la incidencia de la OA en rodilla.

- ¿Es el porcentaje de pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos diferente entre individuos no incidentes (sanos) e incidentes de OA de rodilla?
- ¿Es distinta la pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos de sangre periférica en individuos con clúster de ADNmt HV y JT?
- ¿La pérdida de las secuencias teloméricas y el clúster de ADNmt son factores de riesgo independientes en la incidencia de OA de rodilla? ¿Hay otros factores involucrados?

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Individuos de estudio y obtención de muestras

Individuos y muestras del objetivo 1. Evaluar la dinámica de pérdida de secuencias teloméricas en muestras de leucocitos de sangre periférica, con el fin de predecir la prevalencia y la incidencia de OA en rodilla.

Los individuos de este estudio pertenecen al consorcio *Osteoarthritis Initiative* (OAI). La OAI es un estudio de cohorte multicéntrico con 4.796 adultos con o en riesgo de OA sintomática de rodilla. Está realizada por cuatro centros clínicos (*Memorial Hospital de Rhode Island, Ohio State University, University of Maryland y Johns Hopkins University, y University of Pittsburgh*) que reclutaron participantes entre febrero de 2004 y mayo de 2006 (124).

Para el estudio de la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas tras 72 meses, se ha podido contar con 281 individuos de ascendencia caucásica (129 hombres y 152 mujeres) que presentaban disponibilidad de radiografías en el momento de reclutamiento y tras 72 meses. El rango de edad de la población fue de 45-78 años (media \pm SD= 58,48 \pm 7,27 años) y se desglosaron en tres subcohortes:

- Prevalentes: está formada por sujetos que presentan, en el momento del reclutamiento, un grado radiológico Kellgren/Lawrence (K/L) mayor o igual a 2, y lo mantienen durante los 72 meses de seguimiento (n=144; media \pm SD= 59,44 \pm 7,04 años; rango de edad: 45-78; mujeres: 45,83% y hombres: 54,17%) (tabla 5).
- Incidentes: está compuesta por individuos que no presentan la enfermedad en el momento del reclutamiento, pero que tras los 72 meses de seguimiento desarrollan la OA de rodilla, evidenciada mediante radiología (n=39; media \pm SD= 59,03 \pm 6,97 años; rango de edad: 48-72; mujeres: 66,67% y hombres: 33,33%) (tabla 5).
- No incidentes (sanos): está formada por sujetos radiológicamente sanos en el momento del reclutamiento y tras los 72 meses de seguimiento (n=98; media \pm SD= 56,85 \pm 7,52 años; rango de edad: 45-77; mujeres: 61,22% y hombres: 38,78%) (tabla 5).

De cada sujeto se dispuso de información detallada de la visita basal, momento del reclutamiento, y del seguimiento a los 72 meses. Entre esa

información, se encuentran diferentes parámetros demográficos (edad, género...), clínicos (IMC, presión sistólica y diastólica, máximo grado K/L basal, máximo grado K/L 72 meses, cuestionario WOMAC...) y estudios de imagen (radiología y resonancia magnética) del propio individuo.

Por cada individuo se obtuvieron dos muestras de sangre periférica: a tiempo basal y a 72 meses de seguimiento.

Tabla 5. Datos cohortes OAI.

		No incidentes (n=98)	Incidentes (n=39)	Prevalentes (n=144)	Total (n=281)
Edad (media±SD)		56,85±7,52	59,03±6,97	59,44±7,04	58,48±7,27
Género (n (%))	Mujeres	60 (61,22)	26 (66,67)	66 (45,83)	152 (54,09)
	Hombres	38 (38,78)	13 (33,33)	78 (54,17)	129 (45,91)

Individuos y muestras del objetivo 2. Evaluar la relación del haplogrupo de ADN mitocondrial y la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas como biomarcadores de la incidencia de la OA en rodilla.

Para el estudio de la relación del haplogrupo de ADN mitocondrial y la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas tras 72 meses, se seleccionaron los individuos cuyo haplogrupo de ADN mitocondrial fuese clúster HV o JT (n=268; media= 58,60 años; rango de edad: 45-78). No se incluyeron en los análisis estadísticos el resto de haplogrupos de ADN mitocondrial (KU u otros), ya que su tamaño muestral era muy pequeño (n=13 entre ambos haplogrupos).

De los 268 individuos con haplogrupo JT o HV, se escogieron los sujetos pertenecientes a la subcohorte de controles sanos y de incidencia (n=125; media= 57,58 años; rango de edad: 45-77) para el estudio de la incidencia de la OA de rodilla.

Tabla 6. Secuencia de los cebadores del telómero y gen 36B4.

Cebador de telómero directo (<i>forward</i>):
5'-CGGTTTGTGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTT-3'
Cebador de telómero indirecto (<i>reverse</i>):
5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'
Cebador de 36B4 directo (<i>forward</i>):
5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
Cebador de 36B4 indirecto (<i>reverse</i>):
5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

La estrategia para cuantificar telómeros de forma relativa por PCR cuantitativa se basa en medir, para cada muestra de ADN telomérico, el factor por el cual la muestra difería de una muestra de ADN de referencia de copia única (en nuestro caso 36B4 que codifica para una fosfoproteína ribosómica ácida), relacionando el número de copias de los telómeros con el número de copias del ADN de referencia (126). A esta ratio se la denomina Ratio T/S (T de telómero en inglés *telomere*; y S de gen de copia única, en inglés *single gene*).

En la figura 17, se muestra el procedimiento global de la medida de la longitud relativa del telómero en muestras de sangre periférica mediante qPCR.

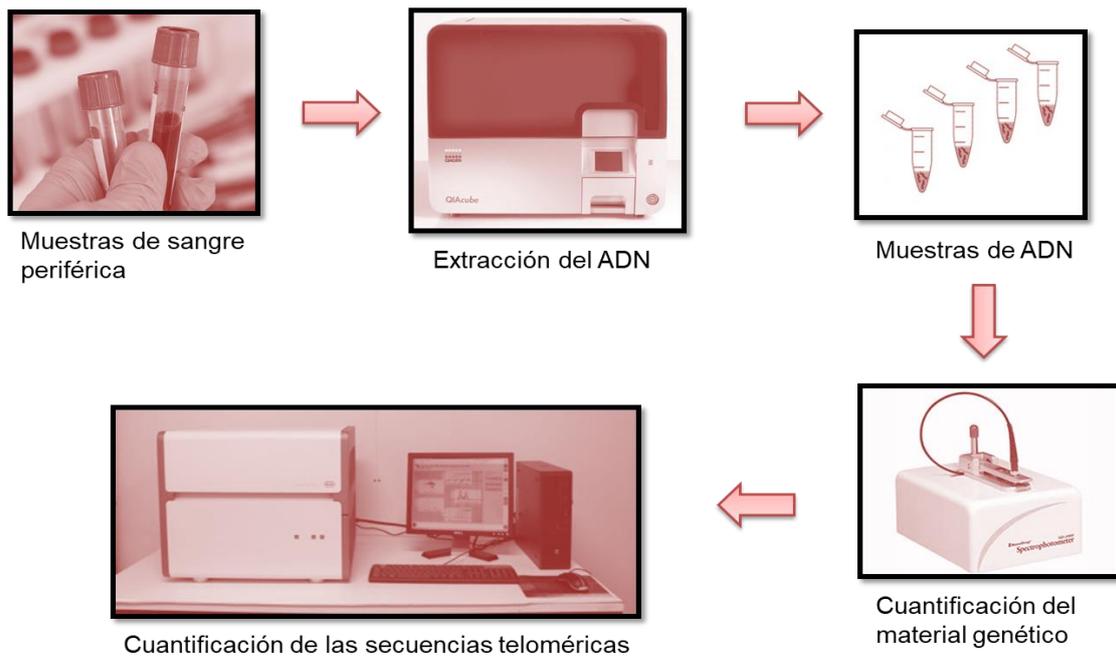


Figura 17. Protocolo a seguir para la cuantificación de las secuencias teloméricas en muestras de sangre.

El ADN de los leucocitos de sangre periférica se extrajo usando el sistema automatizado QIAcube (Qiagen, Alemania) utilizando los reactivos QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen, Alemania). Para la extracción de ADN, se colocaron 200 μ l de sangre en los tubos de muestras para cada visita (basal y 72 meses) de cada individuo. Seguidamente estos tubos se incorporaron en la bandeja de muestras del QIAcube. A continuación, en los adaptadores de la centrífuga, se fueron ubicando los tubos de elución rotulados y las columnas para cada muestra. También se colocaron los reactivos (proteínasa K, solución de lisis, tampón AW1 y AW2, etanol y solución de elución) en sus respectivas posiciones dentro del aparato y se comprobó el abastecimiento de las puntas. Se escogió un volumen final de elución de 100 μ l. El programa de extracción de ADN duró alrededor de 45-50 minutos.

Tras la extracción del material genético de todas las muestras, el ADN fue cuantificado con el espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). Para llevar a cabo este proceso, primeramente, se seleccionó la opción de ADN en el programa informático del instrumento. A continuación, se puso 1 μ l de agua bidestilada sobre el pedestal del NanoDrop

para hacer el blanco y seguidamente se secó el agua con un pañuelo libre de pelusas. Tras ello, se puso 1 µl de la muestra problema sobre el pedestal del NanoDrop y se hizo la medida, que se recogió en el software del aparato

La técnica de qPCR se llevó a cabo en un termociclador a tiempo real LightCycler (LightCycler 480, Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canadá) en placas de 96 pocillos. Las muestras de ADN basales y tras 72 meses de un mismo individuo fueron procesadas simultáneamente en la misma placa de PCR para evitar una posible variabilidad inter-ensayo. Además, las muestras fueron amplificadas por duplicado para el gen de referencia y por cuadruplicado para las secuencias teloméricas. Destacar también que todas las muestras de ADN fueron procesadas sin conocer el estado de los individuos del estudio.

Para preparar la master mix (MM) de la qPCR, se tuvo en cuenta que, en cada pocillo de la placa de 96, tenía que haber 10 µl del kit SYBR Green (LightCycler® 480 Sybr Green I Master, Roche Diagnostics), 2 µl de cebadores de telómero o de 36B4 a 5 µM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA; tabla 6) y 7 µl de H₂O. Además, a la hora de hacer la MM, se tuvo presente el uso de un NTC (non-template control; control sin ADN), el cual nos informa de posibles contaminaciones o dímeros de cebadores; y la utilización de un ADN referencia, para ver si había o no variabilidad entre las placas analizadas. Se estableció que cuando el coeficiente de variación (CV) fuera superior a 5, la placa sería descartada. Finalmente, a cada pocillo se le añadió 1 µl de ADN a 10 ng (menos al NTC) y, por tanto, en cada pocillo habría un total de 20 µl.

Las condiciones de qPCR fueron las utilizadas en el ensayo de Tamayo *et al.* (47), aunque con alguna modificación. Estas se muestran descritas en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de la qPCR.

Paso	Descripción	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	Desnaturalización inicial	95	15'	1
2	Desnaturalización	95	30''	40
	Hibridación	55	1'	
3	Curvas de <i>melting</i>	Elongación	72	10''
			95	5''
			65	1'
		95	Rampa 0,11	1
4	Extensión final	37	15''	1

La especificidad de todas las reacciones se determinó mediante el análisis de las curvas de *melting*, cuyas condiciones se pueden observar en el paso 3 de la tabla 7.

La técnica de qPCR fue optimizada mediante la realización de curvas estándar usando diluciones seriadas de un ADN de referencia. El coeficiente de correlación lineal (R^2) de las rectas de calibrado fue mayor de 0,99 para las curvas del telómero y 36B4. La eficiencia de la amplificación se calculó a partir de la pendiente de la curva lineal, mediante la fórmula: $Eficiencia = 10^{\frac{-1}{Pendiente}}$. En nuestro caso, la eficiencia de la qPCR fue de 1,9 tanto para el set de cebadores de telómero como para los cebadores de 36B4.

El Ratio T/S se calculó empleando el valor de eficiencia obtenida y teniendo en cuenta el ciclo de cuantificación (Ct o Cq) que es el punto de la reacción en el que se ha acumulado un número de amplicones suficientes para ser detectada la fluorescencia en cada muestra:

$$Ratio \frac{T}{S} = \frac{(Eficiencia^{-CqTel})}{(Eficiencia^{-Cq36B4})}$$

Además, para conocer la pérdida de las secuencias teloméricas, se estableció el porcentaje medio de pérdida de las secuencias teloméricas tras 72 meses con respecto las secuencias teloméricas basales en el momento de reclutamiento (porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas):

Porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas (%) =

$$\frac{\left(\text{Ratio } \frac{T}{S} \text{ basal} - \text{Ratio } \frac{T}{S} 72 \text{ meses}\right)}{\text{Ratio } \frac{T}{S} \text{ basal}} \times 100$$

3. Determinación de los haplogrupos de ADN mitocondrial

Con la metodología descrita por Rego *et al.* (118) en 2008, se pueden genotipar los haplogrupos de ADN mitocondrial más comunes de Europa (H, V, K, U, T y J). Esta metodología combina la técnica PCR-RFLP con el método de la extensión de una sola base (SBE del inglés *single-base extension*). La técnica SBE se basa en la hibridación de un único cebador a la secuencia de ADNmt, la cual funciona como molde y presenta el SNP que se está buscando. El cebador empleado tiene en su extremo final 3' una base inmediatamente próxima al sitio polimórfico del molde.

Cuando la base complementaria es incorporada por la Taq polimerasa de ADN, la elongación se paraliza, ya que solo se usan didesoxinucleótidos (ddNTPs). Dependiendo de la fluorescencia emitida, se podrá identificar la base específica del SNP.

Previamente a la SBE se realizó la amplificación de las regiones del ADNmt donde se encuentran los SNPs a caracterizar. Los cebadores fueron diseñados específicamente para amplificar, en una reacción múltiple, los fragmentos de ADNmt que contiene los SNPs que definen los principales haplogrupos mitocondriales europeos (H, V, K, U, T y J). En la tabla 4, vista con anterioridad, se muestran los sitios polimórficos examinados: 7025, 14766, 10394, 4577, 12308 y 4216. Además, se diseñaron 6 cebadores específicos para la SBE con el fin de examinar cada sitio polimórfico.

Tabla 4. Sitios polimórficos del ADNmt utilizados para asignar los principales haplogrupos mitocondriales europeos (118).

Haplogrupo	Sitios Polimórficos					
	7025	14766	10394	4577	12308	4216
H	C	C	A	G	A	T
V	T	C	A	A	A	T
K	T	T	G	G	G	T
U	T	T	A	G	G	T
T	T	T	A	G	A	C
J	T	T	G	G	A	C

A la hora de diseñar los cebadores para la SBE, Rego *et al.* (118) tuvieron en cuenta varias consideraciones:

- La longitud mínima de cada cebador debe ser de 20 nucleótidos.
- Cada cebador debe tener una Tm (temperatura de *melting*) de aproximadamente 60°C.
- La diferencia mínima de longitud entre los 6 cebadores debe ser de 6 nucleótidos para evitar solapamientos. Ahora bien, si los cebadores tuvieran la misma longitud no se podría distinguir qué SNP se corresponde a cada uno de ellos. Por ello, se añadieron nucleótidos inespecíficos al extremo final 5' del cebador para aumentar su longitud.

A continuación, se muestran las secuencias de los cebadores para la PCR-RFLP y SBE (tabla 8).

Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados para la PCR Multiplex, PCR-RFLP y reacción de SBE (Rego, 2008). R: reverse (cebador indirecto); F: forward (cebador directo) (118).

Sitio polimórfico	Cebador para la PCR (5'-3')	Posición	SNP	Cebador para la SBE (5'-3')	Posición
7025	CTGACTGGCATTGTATT AGCA	6960F	C7028T	ACACGACACGTACTACG TTGTAGC	7004F
	GTATACGGGTTCTTCGA ATG	7433R			
14766	GAGAAGGCTTAGAAGA AAACCCAC	14601F	T147766C	cgatcATGAGTGGTTAATT AATTTTATTAGGGGTT A	14798R
	GTGGGCGATTGATGAA AAGGC	14950R			
10394	GGCCTATGAGTGACTAC AAA	10364F	A10398G	ataTATGAGTGACTACAA AAAGGATTAGACTGA	10368F
	TATTCCTAGAAGTGAGA TGGT	10526R			
4577	CCTACCACTCACCTAG CATT	4185F	G4580A	(at) ₇ TTTTTTACCTGAGTA GGCCTAGAAATAAACAT	4548F
	TAGGAATGCGGTAGTA GTTAG	5120R			
12308	CAACCCCGACATCATT CCGGGT	12106F	A12308G	(tacg) ₅ aCCATTGGTCTTA GGCCCCAA	1228F
	GGGTTAACGAGGGTGG TAAGG	12413R			
4216	CCTACCACTCACCTAG CATT	4184F	T4216C	cgCCTACCTCACCTAGCA TTACTTATATGA	4189F
	GCGAGCTTAGCGCTGT GATGAG	4542R			
10032	CTTTGGCTTCGAAGCCG CCGCC	9902F	A10029G		
	TATTCCTAGAAGTGAGA TGGT	10526R			
14465	ATGCCTCAGGATACTCC TCAATAGCCATC	14430F	T14470C		
	CCGTGCGAGAATAATGA TGTATGC	14686R			
8994	TAGCCCACTTCTTACCA CAAGGC	8900F	G8994A		
	GTGTGAAAACGTAGGCT TG	9172R			

La realización de la master mix de la PCR multiplex consistió en una solución tampón de la reacción al 1X (Bioline, London, UK), 0,2 Mm de cada dNTP (Bioline), 1,5 mM MgCl₂ (Bioline), 0,025 unidades/μl de ADN polimerasa BioTaq (Bioline), y 0,3 μM de cada cebador. Posteriormente, se añadió el ADN genómico extraído de las muestras de sangre periférica a una cantidad de 75 ng.

Las condiciones de PCR multiplex se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de la PCR multiplex (118).

Paso	Descripción	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	Calentamiento inicial	94	5'	1
2	Desnaturalización	95	1'	35
	Hibridación	55	1'	
	Elongación	72	1'	
3	Extensión final	37	10'	1

Para eliminar los cebadores y los dNTPs no incorporados en la reacción, los productos de la PCR multiplex se trataron con ExoSAP-IT (Amersham, London, UK). Para ello, se siguieron las recomendaciones del fabricante: 2 μl de la enzima por cada 5 μl de producto de PCR, seguido de una desactivación a 80°C durante 15 minutos. Las muestras se mantuvieron en hielo.

A continuación, las reacciones de SBE multiplex se desarrollaron según las recomendaciones de Applied Biosystems (Foster City, CA), pero con algunas modificaciones. En un volumen final de 10 μl, se añadieron 1,5 μl de la mix de SNaPshot® Multiplex Ready Reaction (SNaPshot Multiplex kit, Applied Biosystems), 2,5 μl del producto de PCR purificado y una concentración final de 0,2 μM de la mezcla de cebadores para SBE.

Las condiciones para SBE se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones de la SBE (118).

Paso	Descripción	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
1	Calentamiento inicial	96	1'	1
2	Desnaturalización	96	10"	25
	Hibridación	60	5"	
	Elongación	60	30"	

Para eliminar los ddNTPs no incorporados, los productos de la reacción de SBE se trataron con fosfatasa alcalina de camarón (Amersham) según las indicaciones del fabricante. Se añadió a la mezcla 1 µl de enzima, 2 µl de la solución tampón de la reacción, y 7 µl de agua destilada, seguido de una activación de la enzima a 37°C durante una hora y una desactivación incubando a 75°C durante 15 minutos. Las muestras se mantuvieron en hielo.

Por último, se mezclaron 9 µl de Formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems), 0,5 µl de un marcador de tamaño conocido (GeneScan-120 LIZ size standard de Applied Biosystems) y 0,5 µl de producto de SBE purificado. La mezcla se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos, y posteriormente se depositó en un analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). El sistema de configuración se basa en un capilar de 36 centímetros de longitud relleno de un polímero optimizado que contiene urea (de Applied Biosystems). El módulo de ejecución del SBE por defecto consistió en un tiempo de inyección de 22 segundos, 16 minutos de tiempo de ejecución y un voltaje de 15 kv.

Los datos se analizaron en un programa informático Gene Mapper v3.5 (Applied Biosystems), que es capaz de designar los diferentes alelos (SNPs) en cada locus de acuerdo con unas secuencias de referencia y que abarca todas las variantes alélicas para cada locus (Tabla 8).

Los haplogrupos menos comunes (W, I y X) se asignaron por medio de análisis de PCR-RFLP de acuerdo con un esquema jerárquico recomendado para identificar los principales haplogrupos de ADNmt (figura 18).

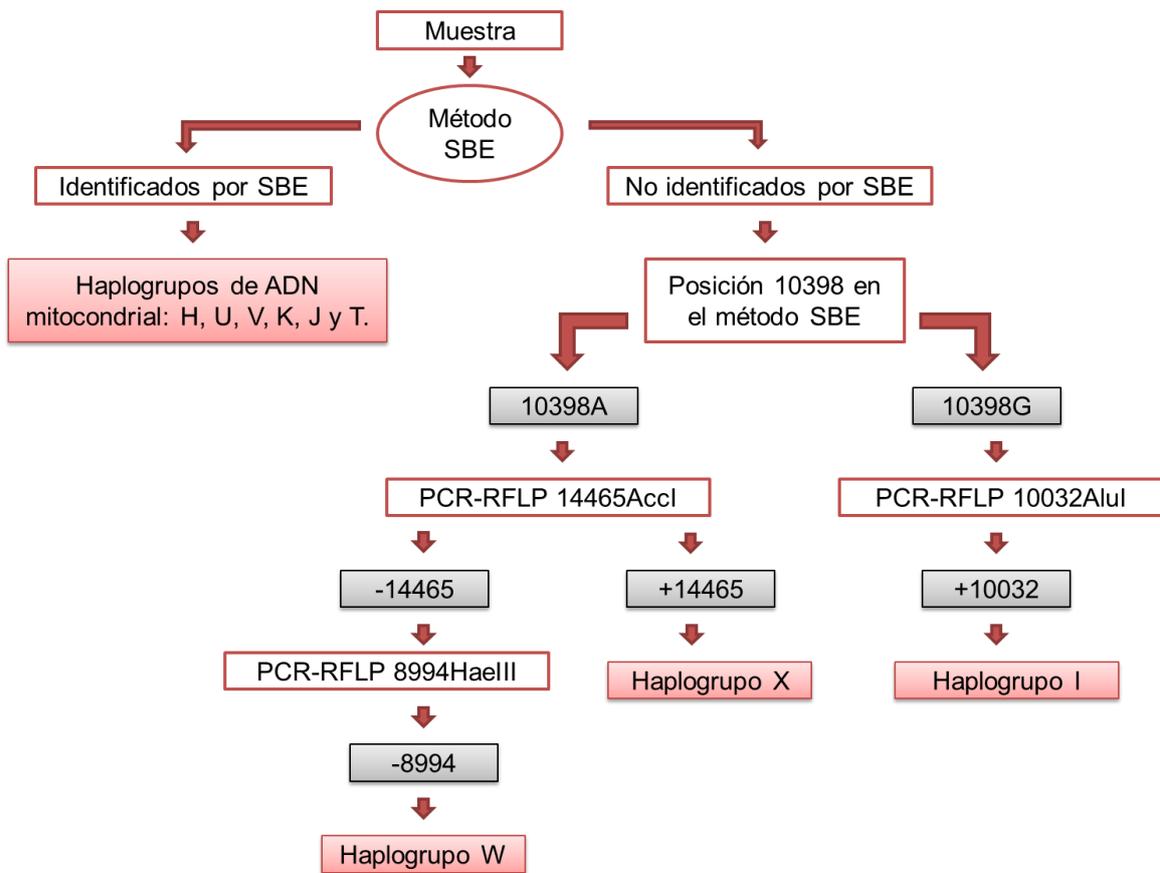


Figura 18. Esquema jerárquico recomendado para identificar los haplogrupos de ADN mitocondrial. Extraído y modificado de (118).

4. Análisis estadístico de los resultados

Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS 20 (Chicago, Llinois, USA). El test de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para determinar la normalidad de la distribución de los datos. La homogeneidad se analizó mediante las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para la comparación entre grupos, ya que son análisis más restrictivos. Las correlaciones fueron estudiadas con la *R* de Spearman. Además, se emplearon análisis multivariantes mediante regresiones logísticas para establecer posibles relaciones causales de los habituales parámetros de salud que están asociados a los factores de riesgo de esta enfermedad con los posibles biomarcadores estudiados en este estudio, porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas y los haplogrupos de ADN mitocondrial,

en la incidencia y prevalencia de la artrosis de rodilla. Los *odds ratio* (OR) y sus intervalos de confianza (IC) al 95% son presentados en el apartado de resultados. Los valores de P inferiores a 0,05 son considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Resultados del objetivo 1. Evaluar la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas en muestras de leucocitos de sangre periférica, con el fin de predecir la prevalencia y la incidencia de OA en rodilla.

1. Características de las diferentes cohortes: No incidente, incidente y prevalente

Como se puede ver en la tabla 11, las principales características de las cohortes que se han estudiado son el IMC, la hipertensión, el máximo KL basal, el porcentaje de pérdida de las secuencias teloméricas y el WOMAC (tabla 11). En la cohorte no incidente (n=98), el IMC medio fue de 25,00 Kg/m², el porcentaje de personas hipertensas fue de 19,39%, el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas fue de 27,70% y la media del cuestionario WOMAC fue de 0,95. El porcentaje de individuos en KL=0 fue de 70,4%, mientras que de KL=1 fue de 29,59%. Por otro lado, en la cohorte incidente (n=39), el IMC medio fue de 29.66 Kg/m², el porcentaje de personas hipertensas fue de 23,08%, el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas fue de 38,51% y la media del cuestionario WOMAC fue de 3,52. El porcentaje de individuos en KL=0 fue de 28,21%, mientras que de KL=1 fue de 71,21%. Finalmente, en la cohorte prevalente (n=144), el IMC medio fue de 29,05 Kg/m², el porcentaje de personas hipertensas fue de 31,25%, el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas fue de 34,37% y la media del cuestionario WOMAC fue de 9,94. El porcentaje de individuos en KL=2 fue de 54,17%, mientras que en KL=3 fue de 33,33% y KL=4 fue de 12,50%.

Tabla 11. Características de las diferentes cohortes.

		No incidentes (n=98)	Incidentes (N=39)	Prevalentes (N=144)	Total (N=281)
IMC (media±SD)		25,00±3,54	29,66±4,28	29,05±4,35	27,72±4,53
Hipertensión (n (%))	Yes	19 (19,39)	9 (23,08)	45 (31,25)	73 (25,98)
	No	79 (80,61)	30 (76,92)	99 (68,75)	208 (74,02)
Máximo KL basal (n (%))	0	69 (70,41)	11 (28,21)	0 (0,00)	80 (28,48)
	1	29 (29,59)	28 (71,79)	0 (0,00)	57 (20,28)
	2	0 (0,00)	0 (0,00)	78 (54,17)	78 (27,76)
	3	0 (0,00)	0 (0,00)	48 (33,33)	48 (17,07)
	4	0 (0,00)	0 (0,00)	18 (12,50)	18 (6,41)
% relativo de pérdida de la secuencias teloméricas (media±SD)		27,70±13,25	38,51±9,33	34,37±11,61	32,62±12,50
WOMAC (media±SD)		0,95±2,29	3,52±3,41	9,94±5,99	3,86±5,19

2. Estudio de la prevalencia en OA de rodilla radiográfica

Los individuos con presencia de OA de rodilla (prevalencia) en el momento del reclutamiento (máximo KL \geq 2; n=144) mostraron un porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos significativamente más alto después de 6 años que aquellos sin OA de rodilla radiográfica al inicio del estudio (máximo KL $<$ 2; n=137; mediana: 35,05 vs 30,44; p=0,018) (Tabla 12A).

El porcentaje relativo medio de pérdida de las teloméricas en leucocitos fue mayor en los hombres que en las mujeres, siendo cercana a la significación estadística (p=0,094). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre individuos con o sin hipertensión (p=0,318) (Tabla 12A).

En relación a las correlaciones, se encontró una correlación positiva entre el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en PBL y el IMC (p=0,010) (Tabla 12B). Sin embargo, la correlación entre la edad y el

deterioro de los telómeros en PBL estuvo cerca del límite de significancia estadística ($p=0.091$) (Tabla 12B).

Tabla 12. Evaluación del porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica de individuos de la cohorte OAI. **(A)** Comparaciones mediante la prueba U de Mann-Whitney. **(B)** Análisis de correlaciones.

		N	Media	95% CI	Mediana	p-valor	
^(A)	Género	Hombre	129	33,98	31,68-36,29	35,76	
		Mujer	152	31,47	29,58-33,35	31,82	0,094
	Hipertensión	NO	208	32,21	30,54-33,89	32,10	0,318
		SI	73	33,78	30,72-36,85	35,24	
	Máximo KL basal	KL <2	137	30,78	28,55-33,00	30,44	0,018
		KL ≥2	144	34,37	32,46-36,29	35,05	
^(B)	Edad (años)					0,091	
	IMC (Kg/m ²)	Spearman's Rank Correlation Coefficient				($r=0,101$)	
						0,010	
						($r=0,153$)	

El análisis multivariable mediante análisis de regresión logística binaria no mostró asociación significativa de la edad, la hipertensión y el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos con la presencia de OA de rodilla (prevalencia) (Tabla 13A). Sin embargo, el IMC (OR: 1,071; $p=0,042$), el género (masculino; OR: 0,577; $p=0,048$) y el WOMAC (OR: 1,273; $p<0,001$) se manifestaron como factores de riesgo de forma significativa con presencia de OA de rodilla (Tabla 13A). Las tres variables significativas previamente identificadas, IMC, sexo e índice WOMAC, fueron introducidas en el modelo de regresión logística de forma conjunta, manteniendo su significancia (Tabla 13B).

Tabla 13. Prevalencia radiográfica de OA de rodilla. **(A)** Análisis multivariante usando regresión logística para evaluar la asociación de las variables con la presencia de artrosis de rodilla. **(B)** Modelo de regresión logística con las variables significativas. La significancia se define como $p < 0,05$.

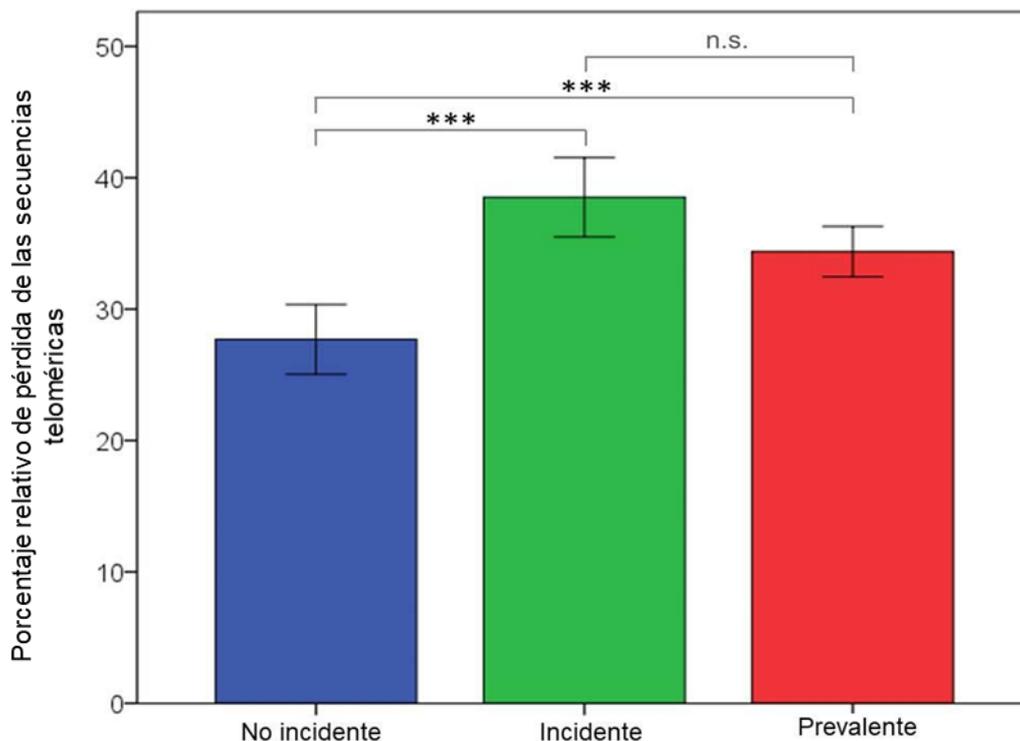
Prevalencia radiográfica de OA de rodilla			
	OR	95% CI	p-valor
(A) Edad (años)	1,030	0,991-1,070	0,134
IMC (Kg/m ²)	1,071	1,002-1,144	0,042
Género (hombre)	0,577	0,334-0,995	0,048
Hipertensión	1,397	0,746-2,616	0,296
% relativo de pérdida de las secuencias teloméricas	1,011	0,989-1,034	0,313
WOMAC	1,273	1,162-1,395	<0,001
(B) IMC (Kg/m ²)	1,082	1,013-1,155	0,019
Género (hombre)	0,558	0,325-0,956	0,034
WOMAC	1,280	1,164-1,396	<0,001

3. Estudio de la incidencia en OA de rodilla radiográfica

Como se puede ver en la tabla 14 y la figura 19, los individuos que desarrollaron OA de rodilla radiográfica durante los 6 años de seguimiento ($n=39$), exhibieron un porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en PBL más alto en comparación con aquellos que permanecieron sin desarrollar OA de rodilla ($n=98$; mediana: 41,36 vs 26,25, $p < 0,001$). Sin embargo, su magnitud de pérdida dinámica no fue significativamente diferente de la de los pacientes con presencia (prevalencia) de artrosis de rodilla (mediana: 41,36 vs 35,05 $p=0,142$) (tabla 14; figura 19).

Tabla 14. Evaluación del porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica de los individuos no incidentes, incidentes y prevalentes de la cohorte OAI, mediante el test *Kruskal Wallis*.

	N	Mean	95% CI	Median	p-valor
No incidente	98	27,70	25,05-30,36	26,25	
Incidente	39	38,51	35,49-41,53	41,36	<0,001
Prevalente	144	34,37	32,46-36,29	35,05	



Nota: ***Significancia del p-valor fue <0,001; n.s, no significativo.

Figura 19. Representación gráfica del porcentaje relativo de la pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos de sangre periférica en OA de rodilla no incidente, incidente y prevalente.

El análisis de regresión logística binaria evidenció que la dinámica de la pérdida de telómeros en leucocitos de sangre periférica fue un factor de riesgo

significativo asociado a la incidencia de OA de rodilla (OR: 1,047; p=0,039), así como el IMC (OR: 1,266; p<0,001), WOMAC (OR: 1,286; p=0,009) y grado máximo de KL al inicio del estudio (OR: 3,988; p=0,009) (Tabla 15A). Por otro lado, no se encontró una asociación significativa entre la edad, el sexo y la hipertensión. El modelo de regresión logística que incluye las cuatro variables previamente reconocidas como significativas, mostró que el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica permaneció significativamente asociado con la aparición de OA de rodilla (incidencia) (OR: 1,043; p=0,041) (Tabla 15B).

Tabla 15. Incidencia radiográfica de OA de rodilla. **(A)** Análisis multivariante usando regresión logística para evaluar la asociación de las variables con la aparición de artrosis de rodilla. **(B)** Modelo de regresión logística con las variables significativas. La significancia se define como p<0,05.

Incidencia radiográfica de OA de rodilla			
	OR	95% CI	p-valor
(A) Edad (años)	1,041	0,971-1,115	0,257
Máximo grado KL basal	3,988	1,420-11,196	0,009
IMC (Kg/m ²)	1,266	1,115-1,437	<0,001
Género (hombre)	2,534	0,872-7,364	0,088
Hipertensión	0,518	0,144-1,858	0,313
% relativo de pérdida de las secuencias teloméricas	1,047	1,002-1,094	0,039
WOMAC	1,286	1,065-1,552	0,009
(B) Máximo grado KL basal	3,627	1,342-9,800	0,011
IMC (Kg/m ²)	1,252	1,106-1,417	<0,001
% relativo de pérdida de las secuencias teloméricas	1,043	1,002-1,087	0,041
WOMAC	1,247	1,034-1,505	0,021

Resultados del objetivo 2. Evaluar la relación del haplogrupo de ADN mitocondrial y la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas como biomarcadores de la incidencia de la OA en rodilla.

Este estudio se realizó en individuos portadores del clúster-haplogrupo de ADNmt HV (n=78) e individuos portadores del clúster-haplogrupo de ADNmt JT (n=47), todos ellos sin signos radiológicos de artrosis de rodilla en el momento del reclutamiento. Se evaluó el porcentaje de incidentes de OA radiológica y el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica tras un periodo de seguimiento de 72 meses. De los 125 sujetos con haplogrupos de ADNmt HV y JT, 39 individuos desarrollaron OA de rodilla (incidentes).

En cuanto a los polimorfismos del ADNmt, los individuos con artrosis de rodilla incidente y portadores del clúster HV (38,46%) son aproximadamente el doble que los individuos con artrosis de rodilla incidente y portadores del clúster JT (19,15%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,024$). Además, el porcentaje relativo de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica fue significativamente menor en los sujetos que portaban el grupo JT que en los que portaban el grupo HV ($p<0,001$) (figura 20A). El acortamiento relativo de las secuencias teloméricas también fue menor en los sujetos no incidentes que en los incidentes ($p<0,001$) (Figura 20B, tabla 16).

Tabla 16. Valores estadísticos del porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica y análisis de las diferencias significativas en individuos no incidentes e incidentes de OA de rodilla, en individuos con clúster de ADNmt HV o JT. La significancia se define como $p < 0,05$.

		N	Q1	Q2	Q3	p-valor	
Individuos	No incidentes	86	19,39	27,79	39,31	< 0,001	
	Incidentes	39	35,47	41,36	44,22		
Haplogrupos de ADNmt	HV	No incidentes	48	23,91	32,72	44,41	0,075
		Incidentes	30	35,88	41,43	44,27	
	JT	No incidentes	38	16,82	21,83	27,05	0,003
		Incidentes	9	25,60	36,49	44,91	

Nota: *p-valor* se calcula mediante el test U de Mann Whitney. Los cuartiles (Q1: inferior, Q2: mediano, Q3: superior) son indicados en la tabla.

En el análisis multivariante mediante regresión logística binaria, se observó que cuando se introducían las variables del clúster de ADNmt y el porcentaje relativo medio de pérdida del telómero en leucocitos de sangre periférica (tabla 17), esta última permaneció significativamente asociada con la incidencia como marcador de riesgo (OR: 1,062, IC 95%: 1,023-1,102, $p=0,001$), por lo que el mayor acortamiento de los telómeros se asoció con un mayor riesgo de incidencia de artrosis de rodilla. El OR se muestra por unidad porcentual de pérdida de telómeros. Por el contrario, la variable del clúster de ADNmt perdió la significación estadística (OR: 0,696, IC del 95 %: 0,264-1,803, $p=0,452$).

Tabla 17. Análisis multivariante mediante regresión logística binaria de la incidencia radiográfica de OA de rodilla en individuos con clúster JT y HV cuando se introducen en el estudio las variables: porcentaje relativo de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica y el clúster de ADNmt. La significancia se define como $p < 0,05$.

Incidencia radiográfica de OA de rodilla en individuos con clúster HV y JT			
	OR	95% CI	p-valor
% relativo de pérdida de las secuencias teloméricas	1,062	1,023-1,102	0,001
Clúster de ADNmt	0,696	0,264-1,803	0,452

Cuando el análisis de regresión logística se estratifico por el clúster de ADNmt (JT y HV), el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos en sangre periférica fue significativamente mayor en los individuos con OA de rodilla incidente que en los individuos no incidentes que portan el grupo JT (OR: 1,125, IC 95%: 1,037- 1,220, $p=0,005$) (Figura 20C, Tabla 18). En los individuos portadores del clúster HV, las diferencias en las tasas de acortamiento de los telómeros en leucocitos de sangre periférica entre no incidentes e incidentes fueron menores y muy cerca del límite de significación estadística (OR: 1,040, IC del 95 %: 0,999-1,084, $p=0,075$) (Figura 20C, Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de regresión logística en la incidencia radiográfica de OA de rodilla estratificada por clúster JT **(A)** y HV **(B)**, utilizando como variable el porcentaje relativo de pérdida de las secuencias teloméricas. La significancia se define como $p < 0,05$.

Incidencia radiográfica de OA de rodilla estratificada por clúster JT y HV			
	OR	95% CI	p-valor
(A) Clúster JT			
% relativo de pérdida de las secuencias teloméricas	1,125	1,037-1,220	0,005
(B) Clúster HV			
% relativo de pérdida de las secuencias teloméricas	1,040	0,999-1,084	0,075

A la hora de incluir otras variables al análisis de regresión logística binaria, como son la edad, el sexo, el IMC, el WOMAC y la hipertensión, se observó que el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica permaneció significativamente asociada con la incidencia (OR: 1,048, IC 95%: 1,007-1,090, $p=0,020$), junto con el IMC (OR: 1,257, IC 95%: 1,116-1,415, $p<0,010$) y el WOMAC (OR: 1,248, IC 95%: 1,039-1,499, $p<0,018$). El resto de variables, tales como la edad, el sexo y la hipertensión, no fueron significativas (Tabla 19).

Tabla 19. Incidencia radiográfica de OA de rodilla en individuos con clúster JT y HV. **(A)** Análisis multivariante usando regresión logística para evaluar la asociación de las variables con la incidencia de artrosis de rodilla. **(B)** Modelo de regresión logística con las variables significativas. La significancia se define como $p<0,05$.

Incidenca radiográfica de OA de rodilla en individuos con clúster HV y JT			
	OR	95% CI	p-valor
(A) Edad (años)	1,038	0,973-1,107	0,263
Género (hombre)	2,266	0,802-6,406	0,123
IMC (Kg/m ²)	1,278	1,127-1,448	<0,001
WOMAC	1,259	1,047-1,515	0,014
Hipertensión	0,607	0,167-2,202	0,447
Clúster ADNmt (HV)	0,888	0,265-2,978	0,848
% relativo de pérdida de las secuencias teloméricas	1,050	1,003-1,100	0,039
(B) IMC (Kg/m ²)	1,257	1,116-1,415	<0,001
WOMAC	1,248	1,039-1,499	0,018
% relativo de pérdida de las secuencias teloméricas	1,048	1,007-1,090	0,020

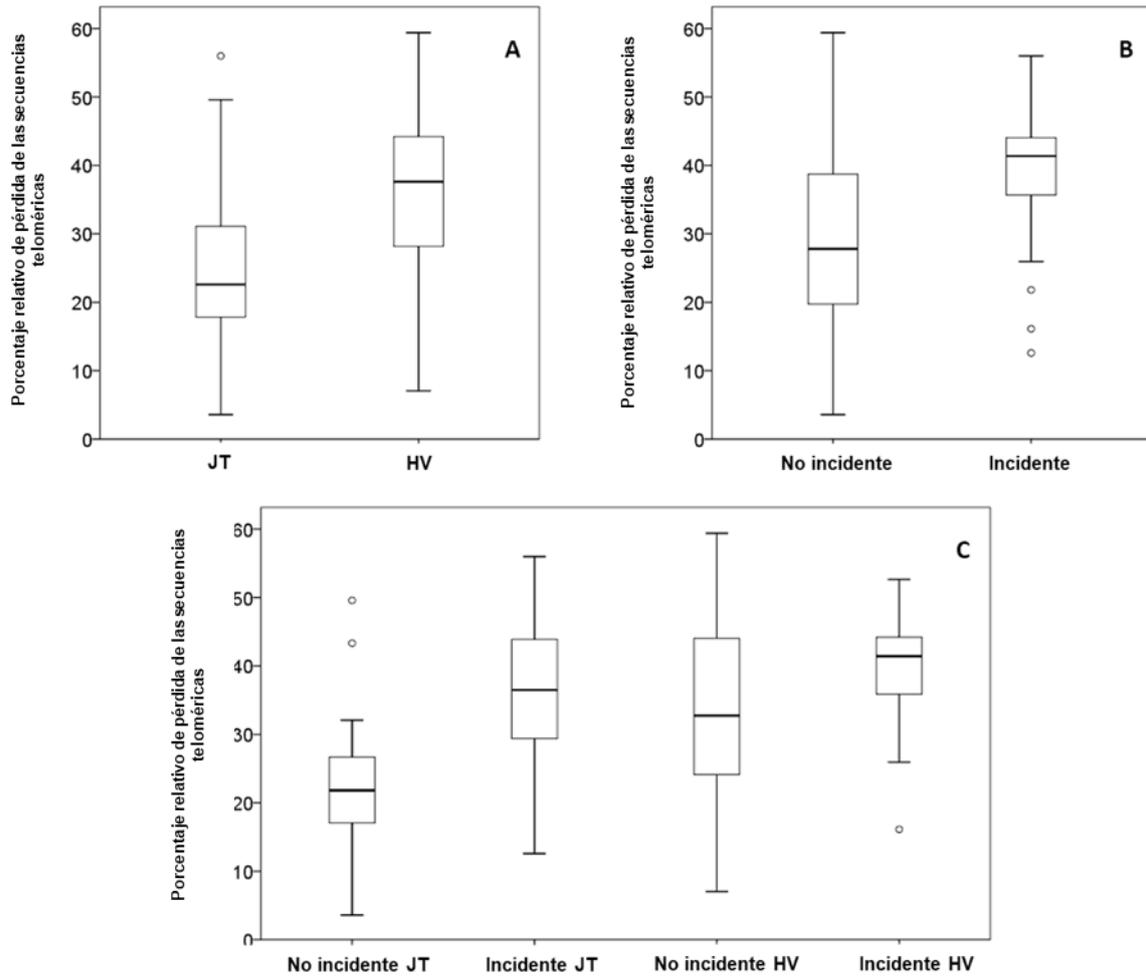


Figura 20. (A) Porcentaje relativo de la pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos de sangre periférica en individuos con clúster de ADNmt JT y HV. **(B)** Porcentaje relativo de la pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos de sangre periférica en individuos no incidentes e incidentes de OA de rodilla. **(C)** Porcentaje relativo de la pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos de sangre periférica en individuos no incidentes e incidentes de OA de rodilla con clúster de ADNmt JT y en individuos no incidentes e incidentes de OA de rodilla con clúster de ADNmt HV.

DISCUSIÓN

La OA de rodilla es una enfermedad caracterizada por la agrupación de perturbaciones en el cartílago articular, hueso subcondral y membrana sinovial (1), cuya prevalencia se incrementa con la edad. El aumento de la prevalencia de esta enfermedad en la población actual, está asociado con ciertos factores de riesgo, tales como el incremento de la esperanza de vida, la obesidad y las lesiones articulares previas. De ellos, el factor de riesgo principal es la edad (15).

Comprender el proceso de envejecimiento es necesario para prevenir enfermedades relacionadas con la edad. La investigación en este ámbito puede aportar ideas sobre el envejecimiento biológico sistémico en enfermedades crónicas, como en el caso de la OA de rodilla.

La disminución del tamaño de los telómeros en leucocitos y el desarrollo de OA son fenotipos relacionados con la edad. Los telómeros de leucocitos reflejan la edad biológica del individuo, que no necesariamente puede coincidir con la edad cronológica. La longitud de los telómeros está determinada por factores genéticos y no genéticos que interactúan a lo largo de la vida.

En cuanto a los factores genéticos, se ha estimado que la heredabilidad del tamaño de los telómeros de leucocitos es de moderada a alta, entre el 36 % y el 84% (68). Por otra parte, los factores estresantes ambientales y los factores del estilo de vida también influyen en el tamaño de los telómeros (69,126). Esta interacción compleja y dinámica de factores genéticos y no genéticos que actúa sobre la longitud de los telómeros de los leucocitos hace que esta medida pueda considerarse un indicador asociado con muchos parámetros relacionados con el envejecimiento biológico general, siendo reflejo del estado de salud global (126).

Numerosos estudios poblacionales indican que la longitud de los telómeros de leucocitos puede predecir la longevidad (71,72,85) y la susceptibilidad a enfermedades relacionadas con la edad, como enfermedades cardiovasculares, diabetes, algunos cánceres y demencia (75,79,80,127,128). Por ejemplo, en la cohorte de Bruneck, la longitud corta de los telómeros al inicio del estudio predijo la incidencia de cáncer independientemente de los factores de riesgo de cáncer estándar (129).

El acortamiento de la longitud de los telómeros en leucocitos de sangre periférica es utilizado como biomarcador de envejecimiento y muchas

enfermedades relacionadas con la edad, ya que mantiene una estrecha correlación con el estrés oxidativo y senescencia celular, dos importantes reguladores del envejecimiento humano. Cabe destacar que un biomarcador se define como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (63). Por ello, la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas en PBL como posible biomarcador de la aparición y/o progresión de la OA en rodilla que se ha propuesto en este trabajo resultaría una nueva prueba más estricta y con mayor confianza de obtención de resultados, además de proporcionar conocimiento sobre cómo está progresando el envejecimiento biológico sistémico y, en conjunción, puede indicar cómo está evolucionando la senescencia articular en la OA de rodilla.

Algunos trabajos previos han tratado de establecer una correlación entre la presencia/ausencia de OA o el nivel de daño articular y la longitud o cantidad de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica (10,41,47,88,97,98,105). Uno de esos estudios observó, mediante análisis de regresión logística multivariable, que el tamaño de los telómeros de leucocitos en sangre periférica en el momento del reclutamiento era un factor de riesgo significativamente asociado con la prevalencia de OA de rodilla al inicio del estudio (10). Además, otra investigación relacionada con la OA de mano, estableció una pérdida de la significación en la asociación del tamaño-cantidad de los telómeros en leucocitos de sangre periférica con la OA de mano prevalente en un modelo ajustado por la edad, sexo e IMC. Sin embargo, la asociación sí se evidenció para la OA de mano incidente (97).

En estos trabajos previos sobre OA y telómeros, la evaluación del telómero ha sido estática, en un momento temporal único y nunca antes se había abordado su porcentaje de pérdida con el paso del tiempo. El presente estudio pretende realizar la primera evaluación de la dinámica, a tiempo basal y tras 72 meses, del porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas en cada individuo de las diferentes cohortes de la OAI. Esta es una evaluación más estricta y precisa que la determinación de los telómeros en un punto de tiempo único y confirma con confianza una mayor pérdida de las secuencias teloméricas de PBL en individuos con OA de rodilla prevalente e incidente.

Los resultados de nuestra investigación sobre el enfoque de la dinámica de la pérdida de las secuencias teloméricas fueron similares a los de la evaluación de OA de la mano en el momento del reclutamiento. Concretamente, el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas no alcanzó significación estadística como factor de riesgo independiente para la presencia de OA de rodilla (prevalencia), sin embargo, los parámetros de IMC, género y WOMAC se identificaron como factores de riesgo para esta enfermedad. Por otro lado, el porcentaje relativo medio de pérdida de las secuencias teloméricas fue un marcador de riesgo independiente significativamente asociado a la aparición de OA de rodilla (incidencia), junto con otros parámetros como el IMC, WOMAC y máximo grado KL basal.

En 2011, Tamayo *et al.* (98) compararon la longitud de los telómeros de condrocitos humanos y leucocitos de sangre periférica. En este estudio, analizaron un grupo de 20 sujetos de control y 39 pacientes con osteoartritis. En los pacientes con osteoartritis, los telómeros eran 1,6 veces más largos en los condrocitos en comparación con los leucocitos. En los sujetos de control, los telómeros de los condrocitos eran incluso dos veces más largos que los telómeros de los leucocitos. Hay que destacar que los condrocitos y los leucocitos tienen un origen de linaje diferente. Los condrocitos derivan de células madre mesenquimales, mientras que los leucocitos se diferencian de células madre hematopoyéticas ubicadas principalmente en la médula ósea de los adultos. Además, los leucocitos y los condrocitos exhiben una tasa de recambio diferente. Ambos son tipos de células diferenciadas. Pero a diferencia de los condrocitos, los leucocitos experimentan un recambio activo, variable según las distintas subpoblaciones mieloides o linfoides, por lo que las células madre hematopoyéticas debería tener mayor actividad mitótica. Aunque poseen cierta actividad telomerasa, esta es insuficiente para prevenir el acortamiento de los telómeros asociado con la replicación del ADN y la división celular. El hecho antes mencionado podría explicar las diferencias en la longitud de los telómeros en estos diferentes tipos de células, ya que los telómeros de los condrocitos son más largos que los telómeros de los leucocitos del mismo sujeto, incluso en pacientes con OA (97,98).

Las diferencias en el linaje y la fisiología de los telómeros entre leucocitos y condrocitos sugieren que la asociación entre el tamaño de los telómeros de leucocitos y el riesgo de presencia de OA de rodilla sería indirecta, en principio.

A este respecto, es importante destacar que, a pesar de estas diferencias, el tamaño de los telómeros de los leucocitos y de otros tejidos parece altamente correlacionados en el mismo individuo (97). Se está reconociendo que la longitud de los telómeros de los leucocitos indica influencias sistémicas sobre el mantenimiento de los telómeros en otros tejidos (126) y esto también debería ser cierto para los condrocitos articulares. Los factores genéticos y no genéticos que intensifican el acortamiento de los telómeros en los condrocitos con OA, incluida la inflamación y el estrés oxidativo (70,97), también podrían ejercer su influencia en las células madre hematopoyéticas, por lo que, en comparación, los telómeros cortos en los leucocitos sanguíneos se correlacionarían con los telómeros relativamente cortos en el cartílago (98).

A nivel local, el acortamiento acelerado de los telómeros implicaría que algunos telómeros de los condrocitos podrían alcanzar un desgaste excesivo prematuro, lo que conduciría a una senescencia articular acelerada. De hecho, la erosión de los telómeros y los indicadores de senescencia celular aumentan con la edad en el cartílago articular y estos cambios proximales parecen amplificarse a las lesiones osteoartriticas en el cartílago (97). Además, las células senescentes secretan una variedad característica de citocinas que inducen un microambiente inflamatorio local, denominado SASP (fenotipo secretor asociado a la senescencia) (130). En los condrocitos senescentes, además de las citocinas proinflamatorias, se produce un aumento de las metaloproteinasas que degradan la matriz del cartílago, agravando la evolución de la OA. Actualmente se han identificado fragmentos de ARN telomérico libre extracelular (*cell-free TERRA*) como un mediador extracelular del fenotipo secretor senescente (45). El estrés telomérico induce la sobretranscripción de TERRA que se secreta en exosomas, induciendo la expresión de citoquinas en las células adyacentes. Es posible que los factores secretados senescentes podrían llegar a la circulación sanguínea y ejerzan efectos sistémicos (97). Además, recientemente se ha reconocido que, especialmente en células con crisis telomérica, TERRA puede traducirse a polidipéptidos valina-arginina (VR)_n

y glicina-leucina (GL)n, los cuales pueden actuar como proteínas de señalización, con un posible papel en el proceso inflamatorio (57). Según esta hipótesis, los propios telómeros de los condrocitos podrían tener un papel causal directo en el desarrollo de la OA (97).

Así pues, se podría decir que los telómeros de los leucocitos reflejarían un trasfondo sistémico de acortamiento de los telómeros, es decir, de envejecimiento acelerado global, que podría interactuar con factores locales adversos presentes en tejidos específicos, potenciando su efecto y aumentando el riesgo de desarrollo de la enfermedad concreta (97). Dependiendo del tejido afectado por los factores dañinos, es posible que se desarrollen diferentes enfermedades relacionadas con la edad. Esta hipótesis podría explicar la aparición de diferentes enfermedades relacionadas con la edad en diferentes individuos; todas ellas demuestran estar asociadas a telómeros leucocitarios más cortos, como enfermedades cardiovasculares, diabetes, demencia o ciertos tipos de cánceres (75,79,80,128,131).

En el caso del cartílago articular, los telómeros cortos en los condrocitos podrían potenciar el efecto adverso de los factores de riesgo de OA. Un factor de alto riesgo conocido en la OA es el estrés mecánico. La aplicación de estrés constante a los condrocitos en cultivo provoca la liberación de ROS y subsiguiente estrés oxidativo. El ataque por ROS puede ser más dañino para los condrocitos con telómeros previamente acortados por envejecimiento global, ya que contienen secuencias ricas en guanina, que son particularmente sensibles al daño oxidativo. Como consecuencia, los telómeros acumularían roturas y se acortarían aún más (97). De este modo se aceleraría la pérdida de secuencias teloméricas, llegando algunos telómeros al tamaño crítico, lo que resultaría en una senescencia prematura de los condrocitos. De esta forma la degeneración del cartílago en la osteoartritis postraumática podría estar mediada por la senescencia acelerada de los condrocitos (132).

Enlazando con el papel de ROS y el estrés oxidativo, la función mitocondrial también parece tener un papel relevante en la OA de rodilla. Numerosos estudios han descrito la utilidad de los haplogrupos de ADNmt como biomarcador de la incidencia y pronóstico de la OA (18,119,122,133). En este

trabajo también se ha querido evaluar el haplogrupo de ADNmt como posible biomarcador de la incidencia de la OA en rodilla, junto con el porcentaje relativo de pérdida de secuencias teloméricas. Estudios anteriores han descrito la posible asociación de la dinámica del telómero y el haplogrupo de ADNmt con la OA de rodilla, pero siempre de forma independiente (10,18).

En nuestra investigación, concretamente en la incidencia de la OA de rodilla, el porcentaje relativo de pérdida de las secuencias teloméricas en los portadores del clúster de ADNmt JT fue menor que el de los portadores del grupo HV, aunque los individuos de este grupo son el doble. Este hecho concuerda con el estudio obtenido por Fernández-Moreno *et al*, en el cual establecieron que el haplogrupo de ANDmt J es menos susceptible al estrés oxidativo y, por tanto, los individuos con dicho haplogrupo parecían presentar unos telómeros más largos (123). Los polimorfismos (SNP) que caracterizan al haplogrupo JT pueden disminuir la eficiencia del acoplamiento mitocondrial, reduciendo tanto la producción de ATP como de ROS, así como la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, el complemento y la apoptosis (18,134), lo que ocasionaría un menor estrés oxidativo en el individuo que conllevaría a un menor porcentaje relativo de caída de secuencias teloméricas a nivel global. A nivel del cartílago, la mayor generación de ROS en los condrocitos que llevan el clúster HV de mtDNA puede dañar el ADN telomérico, favoreciendo la senescencia dependiente de la longitud de los telómeros, a diferencia del fenotipo menos inflamatorio y oxidativo de los portadores del grupo JT.

Como se ha indicado previamente, la influencia del haplogrupo de ADNmt HV o JT sobre el riesgo de incidencia de OA de rodilla parece derivarse de la actividad oxidativa dañina en el cuerpo. Pero el análisis multivariado evidencia que este efecto nocivo ya está siendo registrado con el estudio de la dinámica de acortamiento telomérico en leucocitos. Esto no quiere decir que el haplogrupo de ADNmt tenga menos importancia en la incidencia de OA de rodilla, sino que es posible que estemos viendo su efecto a través del porcentaje relativo de pérdida de las secuencias teloméricas. Es decir, que ambos marcadores estarían interconectados.

Otro factor de riesgo clásico de OA es la obesidad y el IMC, tal como evidenció nuestra regresión logística. El estrés oxidativo y la inflamación subclínica crónica asociados con un perfil metabólico modificado son propios de la obesidad. La obesidad y el síndrome metabólico favorecen el envejecimiento biológico y están asociados con telómeros leucocitarios más cortos (135). En este sentido, se evidenció que el aumento de la adiposidad abdominal está asociado con un acortamiento de los telómeros de leucocitos (136). Nuestro estudio mostró una clara influencia del IMC en el desarrollo de la OA y el acortamiento de los telómeros de leucocitos.

Parece paradójico que la determinación única de la cantidad de secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica en el momento del reclutamiento se pueda asociar significativamente con OA de rodilla prevalente (10), mientras que la dinámica de pérdida de los telómeros no. Sin embargo, a pesar de que el acortamiento telomérico en leucocitos de sangre periférica en nuestro grupo de individuos con OA de rodilla prevalente fue menor que el de los sujetos con OA incidente, sí que fue mayor en comparación con los sujetos no incidentes, siendo este resultado estadísticamente significativo.

Se ha descrito que el telómero podría tender a acortarse más si se parte de secuencias más largas que de cortas, lo cual podría depender de la edad de los individuos de OAI. Si la edad de los prevalentes fuese mayor que la de los incidentes, esto podría afectar a nuestros resultados y explicar por qué no se observa asociación entre la pérdida de secuencia teloméricas en el tiempo y la prevalencia de OA de rodilla. Es importante resaltar que ambos grupos mostraron el mismo rango de edad en el momento del reclutamiento (prevalentes: $59,44 \pm 7,04$; incidentes: $59,03 \pm 6,97$).

Una pérdida relativamente acelerada de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica puede indicar una progresión rápida del envejecimiento biológico a nivel sistémico, que localmente, en el cartílago articular, puede estar relacionado con la senescencia acelerada de los condrocitos y el posterior desarrollo de la OA de rodilla, es decir, la incidencia. Una vez que se establece la enfermedad, los telómeros se erosionarían a un ritmo menor. De hecho, el porcentaje de acortamiento telomérico en leucocitos de sangre periférica no es homogéneo a lo largo de la vida, siendo más intenso

durante los primeros años y disminuyendo ligeramente con el envejecimiento (137). Dado que el envejecimiento biológico puede acelerarse en la OA, la cinética de desaceleración progresiva podría cambiarse a edades cronológicas más tempranas.

La pérdida de secuencias teloméricas a lo largo del tiempo predice el riesgo de incidencia de OA de rodilla independientemente de otros factores de riesgo bien establecidos, como el grado KL inicial, el IMC y el índice WOMAC. El hecho de que estos factores de riesgo bien establecidos también sean significativos en el modelo de regresión logística no descarta la asociación de la pérdida de las secuencias teloméricas. Cada uno de estos factores de riesgo, incluido el porcentaje de pérdida de las secuencias teloméricas, participa en el riesgo con una magnitud específica. Sí que es evidente que el OR para la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos parece modesto en comparación con otros posibles factores de riesgo. Pero hay que tener en cuenta que esta influencia en la incidencia ya es detectada a pesar de estar evaluada en un número reducido de individuos (n=39). Posiblemente, el impacto del mecanismo fisiopatológico subyacente a la pérdida de secuencias teloméricas de leucocitos es más fuerte para el surgimiento de la enfermedad (incidencia), pero una vez establecido, pierde intensidad (prevalencia).

Se puede especular que un factor que influye o está asociado con una gran variedad de factores de salud, como el tamaño de los telómeros de PBL, posiblemente lo haga de forma sutil en la mayoría de los individuos. Si el efecto fuera muy intenso, estaría relacionado con problemas de salud más graves, como ocurre en enfermedades genéticas relacionadas con mutaciones en genes implicados en la fisiología de los telómeros.

En relación con otros factores de riesgo reconocidos de OA, como la edad, podría pensarse que esta debe correlacionarse con la tasa de pérdida de secuencias teloméricas, por lo que podría ejercer un efecto de confusión en la relación entre el porcentaje de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos y la OA de rodilla. Pero la edad se correlaciona con el tamaño de los telómeros (punto estático), lo cual que no es lo mismo que la tasa de pérdida de las secuencias teloméricas. Esta correlación es más evidente cuando la muestra contiene un amplio rango de edad de los participantes. En nuestra muestra, el

tamaño inicial de los telómeros (relación T/S inicial) mostró una correlación significativa con la edad de los sujetos del estudio (rho de Spearman; $r = -0,158$, $p = 0,008$). El valor de r es bajo debido al rango de edad restringido de la población, lo cual obviamente es debido al propio desarrollo natural de esta patología. Sin embargo, el porcentaje de pérdida de las secuencias teloméricas después de 6 años con respecto al valor inicial no se correlaciona con la edad (rho de Spearman; $r = 0,101$, $p = 0,091$). La casi significancia hace que la edad deba considerarse en el análisis de regresión, porque podría ser un factor de confusión. Cuando el análisis multivariado incluye el factor edad junto con el porcentaje de pérdida de las secuencias teloméricas, la edad no parece asociarse significativamente con la incidencia, mientras que el porcentaje de pérdida de las secuencias teloméricas de leucocitos mantiene su significación. Este resultado sugiere que la pérdida de las secuencias teloméricas de PBL incluía la supuesta información de riesgo de incidencia de OA de rodilla proporcionada por el factor edad.

Al igual que la edad, la hipertensión puede estar asociada con el tamaño de los telómeros de leucocitos (138) y podrían ser concomitante en pacientes con OA y comportarse como factor de confusión. De hecho, los telómeros de leucocitos iniciales fueron significativamente más cortos en personas con hipertensión. Sin embargo, la hipertensión no alcanzó significación estadística como factor de riesgo asociado para la OA de rodilla prevalente cuando se introdujo el tamaño de los telómeros en el análisis de regresión logística. Sin embargo, la tensión arterial se estimó en el momento del reclutamiento y sería necesaria una evaluación en relación con la pérdida de telómeros de leucocitos después de los seis años de seguimiento.

En cuanto a la influencia del género los hombres mostraron un riesgo significativamente menor de padecer OA prevalente, y mayor, no significativo, para incidencia. Pero en este caso hay que tener en cuenta que se trata de un pequeño subgrupo de la cohorte total de OAI.

En resumen, el acortamiento telomérico de leucocitos es un factor de riesgo independiente asociado a la aparición de OA de rodilla. La OA de rodilla se desarrolla principalmente en el grupo de sujetos con una mayor pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de sangre periférica a lo largo del

tiempo, es decir, con un fenotipo de envejecimiento biológico acelerado (88). Este fondo fisiológico desfavorable potenciaría la senescencia de los condrocitos, disminuyendo la resistencia del cartílago a otros estresores mecánicos, metabólicos, inflamatorios u oxidativos (139). Algunos de estos factores estresantes pueden estar relacionados con factores de riesgo evidenciados en el análisis de regresión logística, como el IMC, que puede estar relacionado con la obesidad. La confluencia de todos estos factores contribuiría a la aparición y progresión de la destrucción articular.

Este presente estudio es de cohortes retrospectivo, limitado a un subconjunto de sujetos caucásicos y los resultados respaldan una validación futura utilizando cohortes prospectivas. El tamaño muestral de individuos con OA de rodilla incidente no es muy elevado, pero esto es inevitable y está necesariamente relacionado con la evolución natural de la propia patología tras la selección de individuos sanos. La cohorte de la OAI tiene el más alto nivel de calidad. Es una tarea muy difícil obtener sujetos “sanos” y además con un seguimiento de seis años, evaluar la incidencia o no de OA de rodilla. Esta condición en el tamaño de la muestra es inevitable.

CONCLUSIONES

Conclusiones del objetivo 1. Evaluar la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas en muestras de leucocitos de sangre periférica, con el fin de predecir la prevalencia y la incidencia de OA en rodilla.

- El porcentaje relativo medio de pérdida de secuencias teloméricas en leucocitos fue menor en los individuos no incidentes (sanos) que en los individuos que ya padecen o van a desarrollar OA de rodilla durante los 72 meses de seguimiento. Los individuos que desarrollaron OA de rodilla durante los 72 meses presentaron una pérdida de secuencias teloméricas mayor que los individuos que ya padecían la enfermedad.
- La dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos no fue significativo como factor de riesgo para la prevalencia de OA de rodilla. Por otra parte, los parámetros IMC, género y WOMAC sí fueron significativos como factores de riesgo para la prevalencia de OA de rodilla.
- La reducción de las secuencias teloméricas en leucocitos se evidenció como un factor de riesgo independiente asociado a la incidencia de OA de rodilla, junto con otros parámetros como el IMC, WOMAC y máximo grado KL basal.

Conclusiones del objetivo 2. Evaluar la relación del haplogrupo de ADN mitocondrial y la dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas como biomarcadores de la incidencia de la OA en rodilla.

- El porcentaje relativo medio de pérdida de secuencias teloméricas en leucocitos de individuos no incidentes (sanos) fue significativamente menor que en los individuos incidentes.
- La pérdida de las secuencias teloméricas en leucocitos de individuos no incidentes (sanos) e incidentes con el clúster de haplogrupo de ADNmt HV fue significativamente mayor que en los individuos no incidentes (sanos) e incidentes con el clúster de haplogrupo de ADNmt JT.
- La dinámica de pérdida de las secuencias teloméricas se demostró como factor de riesgo independiente asociado a la incidencia de OA de rodilla, junto con el WOMAC e IMC. La influencia del haplogrupo de ADNmt estaría registrada por dicha dinámica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blanco F, Rego-Pérez I. Fisiopatología de la artrosis. In: Benito Ruiz P, Blanco García F, Tornero Molina J, Möller Parera I, Monfort Faure J, Battle-Gualda E, editors. Artrosis, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. España: Médica Panamericana; 2010. p. 163–82.
2. Alonso Ruiz A, Alperi López M, Álvaro-Gracia Álvaro J, Andreu Sánchez J, Arboleya Rodríguez L, Balsa Criado A, et al. Manual SER de enfermedades reumáticas. 6ª. España: Elsevier; 2014.
3. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage. Clin Sports Med. 2017;36(3):413–25.
4. Sacitharan PK. Ageing and osteoarthritis. In: Harris J, Korolchuk V, editors. Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part II Clinical Science. Springer Nature Singapore; 2019. p. 123–59.
5. Nogueira Recalde U. Identificación de moléculas reguladoras del envejecimiento articular para el tratamiento de la artrosis [Tesis doctoral]. Galicia: Universidade da Coruña; 2019. Available from: <http://hdl.handle.net/2183/24471>
6. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. Nat Rev Dis Prim. 2016;2:16072.
7. Li Y, Wei X, Zhou J, Wei L. The age-related changes in cartilage and osteoarthritis. Biomed Res Int. 2013;2013:916530.
8. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage Diseases. Matrix Biol. 2018;71–72:51–69.
9. Lane NE, Shidara K, Wise BL. Osteoarthritis year in review 2016: clinical. Osteoarthr Cartil. 2017;25(2):209–15.
10. Mosquera A, Rego-Pérez I, Blanco F, Fernández J. Leukocyte Telomere Length in Patients with Radiographic Knee Osteoarthritis. Environ Mol Mutagen. 2019;60(3):298–301.
11. Sakalauskiene G, Jauniškiene D. Osteoarthritis: Etiology, epidemiology, impact on the individual and society and the main principles of management. Med. 2010;46(11):790–7.

12. Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin.* 2013;19(1):1–19.
13. Hawker GA. Osteoarthritis is a serious disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2019;37(Suppl. 120):S3–6.
14. Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(7):412–20.
15. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet.* 2019;393(10182):1745–59.
16. Rezuş E, Cardoneanu A, Burlui A, Luca A, Codreanu C, Tamba BI, et al. The link between inflammaging and degenerative joint diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3):614.
17. Millerand M, Berenbaum F, Jacques C. Danger signals and inflammaging in osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2019;37(Suppl. 120):S48–56.
18. Fernández-Moreno M, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, Cortés-Pereira E, Relaño S, Hermida-Gómez T, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence the risk of incident knee osteoarthritis in OAI and CHECK cohorts. A meta-Analysis and functional study. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):1114–22.
19. Blanco FJ, Silva-Díaz M, Quevedo Vila V, Seoane-Mato D, Pérez Ruiz F, Juan-Mas A, et al. Prevalence of symptomatic osteoarthritis in Spain: EPISER2016 study. *Reumatol Clin.* 2020;17(8):461–70.
20. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Stratification for Clinical Trials and Clinical Use. *Osteoarthr Cartil.* 2016;23(8):1233–41.
21. Wittenauer R, Smith L, Aden K. Background Paper 6.12 Osteoarthritis. *World Heal Organ.* 2013.
22. Nelson AE. Osteoarthritis year in review 2017: clinical. *Osteoarthr Cartil.* 2018;26(3):319–25.
23. Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. Osteoarthritis. *Lancet.* 2015;386(9991):376–87.
24. Buckwalter JA, Martin JA. Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev.*

- 2006;58(2):150–67.
25. Fernandez-Lopez JC, Laffon A, Blanco FJ, Carmona L, EPISER Study Group. Prevalence, risk factors, and impact of knee pain suggesting osteoarthritis in Spain. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(2):324–32.
 26. Prieto-alhambra D, Judge A, Javaid MK, Cooper C, Diez-perez A, Arden NK. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:1659–64.
 27. Allen K, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence. *Curr Opin Rheumatol*. 2015;27(3):276–83.
 28. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014;28(1):5–15.
 29. Aguilera Cros C, Blanco Rubio C, Borrego Gómez M, Cano Rodríguez A, Cobos Romana R, Crespo Rivero T, et al. Rotación del residente de Medicina Familiar y Comunitaria por Reumatología. Sevilla: You&Us. 2016.
 30. Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26035–54.
 31. Toh WS, Brittberg M, Farr J, Foldager CB, Gomoll H, Hoi J, et al. Cellular senescence in aging and osteoarthritis. *Acta Orthop*. 2016;87(sup363):6–14.
 32. Saccomano SJ. Osteoarthritis treatment: Decreasing pain, improving mobility. *Nurse Pract*. 2018;43(9):49–55.
 33. Mas Garriga X. Definición, etiopatogenia, clasificación y formas de presentación. *Atención primaria*. 2014;46:3–10.
 34. Cajigas Melgoza JC, Ariza Andraca R, Espinosa Morales R, Méndez Medina C, Mirassou Ortega M, San Román MR, et al. Guía de práctica clínica basada en la evidencia para el diagnóstico y tratamiento de la osteoartritis. *Med Interna Mex*. 2011;27(6):552–72.
 35. Herrero Labarra P. Tratamiento de la artrosis. Nuevas terapias en investigación. Adherencia [Trabajo fin de grado]. Madrid: Universidad

- Complutense de Madrid; 2017. Available from: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/54712/>
36. Alonso Ruiz A. Opioides en la artrosis. De las guías a la práctica clínica. *Reumatol Clin*. 2009;5(S2):15–8.
 37. Fernández-Liz E, López-Pareja N, Rifà-Ros A, Maudos-Pérez M. La desprescripción de fármacos sintomáticos de acción lenta para el tratamiento de la artrosis. *Aten Primaria*. 2014;46(9):522–3.
 38. Permy M, Guede D, López-peña M, Muñoz F, Caeiro J ramón, González-Cantalapiedra A. Comparison of various SYSADOA for the osteoarthritis treatment : an experimental study in rabbits. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16:120.
 39. Herrmann M, Pusceddu I, Herrmann W. Telomere biology and age-related diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(8):1210–22.
 40. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005;6(8):611–22.
 41. Vidal-Bralo L. Análisis de la longitud de lo telómeros y biomarcadores epigenéticos de la edad en pacientes con artrosis o con artritis reumatoide [Tesis doctoral]. Galicia: Universidad de Santiago de Compostela; 2017. Available from: <http://hdl.handle.net/10347/15341>
 42. Fernández-Marcelo T. Telómeros y factores de senescencia y muerte celular en cáncer no microcítico de pulmón y en cáncer colorrectal [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2014. Available from: <http://eprints.ucm.es/25651/1/T35384.pdf>
 43. Martínez P, Blasco MA. Telomeres, Heart-breaking. *Circ Res*. 2018;123(7):787–802.
 44. Arvelo F, Morales A. Telomero, telomerasa y cancer. *Acta Cient Venez*. 2004;55:288–303.
 45. Wang Z, Deng Z, Dahmane N, Tsai K, Wang P, Williams DR, et al. Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) constitutes a nucleoprotein component of extracellular inflammatory exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(46):E6293–300.

46. Nergadze SG, Farnung BO, Wischnewski H, Khoraiuli L, Vitelli V, Chawla R, et al. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. *RNA*. 2009;15:2186–94.
47. Tamayo M, Mosquera A, Rego JI, Fernández-Sueiro JL, Blanco FJ, Fernández JL. Differing patterns of peripheral blood leukocyte telomere length in rheumatologic diseases. *Mutat Res*. 2010;683(1–2):68–73.
48. Poonpet T, Saetan N, Tanavalee A, Wilairatana V, Yuktanandana P, Honsawek S. Association between leukocyte telomere length and angiogenic cytokines in knee osteoarthritis. *Int J Rheum Dis*. 2018;21(1):118–25.
49. Saretzki G. Telomeres, telomerase and ageing. In: Harris J, Korolchuk V, editors. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science*. Springer Nature Singapore; 2018. p. 221–308.
50. Agarwal M. Telomeres and Diseases. *J Assoc Physicians India*. 2014;62(10):9–11.
51. Srinivas N, Rachakonda S, Kumar R. Telomeres and telomere length: A general overview. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):558.
52. Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol*. 2007;3(10):640–9.
53. Gonzalez-Vasconcellos I, Alonso-Rodríguez S, López-Baltar I, Fernández JL. Telomere Chromatin Condensation Assay (TCCA): A novel approach to study structural telomere integrity. *Mutat Res*. 2015;771:51–5.
54. Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet*. 2007;8:299–309.
55. Gonzalez-Vasconcellos I, Schneider R, Anastasov N, Alonso-Rodríguez S, Sanli-Bonazzi B, Fernández JL, et al. The Rb1 tumour suppressor gene modifies telomeric chromatin architecture by regulating TERRA expression. *Sci Rep*. 2017;7:42056.
56. Lalonde M, Chartrand P. TERRA, a multifaceted regulator of telomerase activity at telomeres. *J Mol Biol*. 2020;432(15):4232–43.

57. Al-Turki TM, Griffith JD. Mammalian telomeric RNA (TERRA) can be translated to produce valine-arginine and glycine-leucine dipeptide repeat proteins. *PNAS*. 2023;120(9):2221529120.
58. Zhu Y, Liu X, Ding X, Wang F, Geng X. Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology*. 2019;20:1–16.
59. Hayflick L, Moorhead P. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585–621.
60. Fernández JL, González-Vasconcellos I. Telomeres in Germ Line and Early Embryo: An Overview. In: Horcajadas J, Gonsálvez J, editors. *Reproductomics: The -Omics Revolution and Its Impact on Human Reproductive Medicine*. Elsevier; 2018. p. 77–90.
61. Schoeftner S, Blasco MA. A higher order of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *EMBO J*. 2009;28(16):2323–36.
62. Gonzalez-Vasconcellos I. Loss of the caretaker function of the Rb1 tumour suppressor gene triggers radiation-induced cancer [Tesis doctoral]. Alemania: Universidad Técnica de Múnich; 2011. Available from: <http://mediatum.ub.tum.de/?id=1096996>
63. Gorenjak V, Akbar S, Stathopoulou MG, Visvikis-Siest S. The future of telomere length in personalized medicine. *Front Biosci*. 2018;23:1628–54.
64. Liu J, Wang L, Wang Z, Liu J. Roles of telomere biology in cell senescence, replicative and chronological ageing. *Cells*. 2019;8(1):54.
65. Kordinas V, Ioannidis A, Chatzipanagiotou S. The telomere/telomerase system in chronic inflammatory diseases. Cause or effect?. *Genes*. 2016;7(9):60.
66. Naciones Unidas. La población mundial sigue en aumento, aunque sea cada vez más vieja [Internet]. 2019 [cited 2021 Sep 15]. Available from: <https://www.un.org/development/desa/es/news/population/world-population-prospects-2019.html>
67. Loeser R. Aging and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(5):492–6.

68. Aviv A. Genetics of leukocyte telomere length and its role in atherosclerosis. *Mutat Res.* 2012;730(1–2):68–74.
69. Puterman E, Gemmill A, Karasek D, Weir D, Adler NE, Prather AA, et al. Lifespan adversity and later adulthood telomere length in the nationally representative US Health and Retirement Study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(42):E6335–42.
70. Houben JMJ, Moonen HJJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med.* 2008;44(3):235–46.
71. Deelen J, Beekman M, Codd V, Trompet S, Broer L, Hägg S, et al. Leukocyte telomere length associates with prospective mortality independent of immune-related parameters and known genetic markers. *Int J Epidemiol.* 2014;43(3):878–86.
72. Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Peripheral blood leukocyte telomere length and mortality among 64 637 individuals from the general population. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(6):djv074.
73. Zeichner SL, Palumbo P, Feng YR, Xiao X, Gee D, Sleasman J, et al. Rapid telomere shortening in children. *Blood.* 1999;93(9):2824–30.
74. Heidinger BJ, Blount JD, Boner W, Griffiths K, Metcalfe NB, Monaghan P. Telomere length in early life predicts lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(5):1743–8.
75. Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, Butterworth AS, Thompson A, Willeit P. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2014;349:g4227.
76. Zhao Z, Pan X, Liu L, Liu N. Telomere length maintenance, shortening, and lengthening. *J Cell Physiol.* 2014;229(10):1323–9.
77. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res.* 2013;319(2):133–41.
78. Wentzensen I, Mirabello L, Pfeiffer R, Savage S. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers.* 2011;20(6):1238–50.

79. Codd V, Nelson C, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton J, et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet.* 2013;45(4):422–7.
80. Zhan Y, Song C, Karlsson R, Tillander A, Reynolds CA, Pedersen NL, et al. Telomere length shortening and Alzheimer disease-A mendelian randomization study. *JAMA Neurol.* 2015;72(10):1202–3.
81. Thilagavathi J, Mishra SS, Kumar M, Vemprala K, Deka D, Dhadwal V, et al. Analysis of telomere length in couples experiencing idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:793–8.
82. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, Depinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell.* 1997;91(1):25–34.
83. Armanios M, Alder JK, Parry EM, Karim B, Strong MA, Greider CW. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am J Hum Genet.* 2009;85(6):823–32.
84. Bakaysa SL, Mucci LA, Slagboom PE, Boomsma DI, McClearn GE, Johansson B, et al. Telomere length predicts survival independent of genetic influences. *Aging Cell.* 2007;6(6):769–74.
85. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 2003;361(9355):393–5.
86. Dehbi AZA, Radstake TRDJ, Ca J. Accelerated telomere shortening in rheumatic diseases: cause or consequence? *Expert Rev Clin Immunol.* 2013;9(12):1193–204.
87. Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarkers of aging: from function to molecular biology. *Nutrients.* 2016;8(6):338.
88. Vidal-Bralo L, López-Golan Y, Mera-Varela A, Rego-Pérez I, Zhang Y, Real Á, et al. Specific premature epigenetic aging of cartilage in osteoarthritis. *Aging (Albany NY).* 2016;8(9):2222–30.
89. Meissner C, Ritz-Timme S. Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci Int.* 2010;203(1–3):34–43.

90. Takubo K, Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Ishikawa N, Sawabe M, Kurabayashi R, et al. Changes of telomere length with aging. *Geriatr Gerontol Int.* 2010;10(Suppl. 1):S197–206.
91. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun.* 2013;4:1597.
92. Mather KA, Jorm AF, Parslow RA, Christensen H. Is telomere length a biomarker of aging? A review. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011;66A(2):202–13.
93. Turner K, Vasu V, Griffin D. Telomere biology and human phenotype. *Cells.* 2019;8(1):73.
94. Armanios M. Telomeres and age-related disease: How telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest.* 2013;123(3):996–1002.
95. Blackburn EH, Epel ES, Lin J. Human telomere biology: a contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science.* 2015;350(6265):1193–8.
96. Kuszel L, Trzeciak T, Richter M, Czarny-Ratajczak M. Osteoarthritis and telomere shortening. *J Appl Genet.* 2015;56:169–76.
97. McAlindon T, Roberts M, Driban J, Schaefer L, Haugen IK, Smith SE, et al. Incident hand OA is strongly associated with reduced peripheral blood leukocyte telomere length. *Osteoarthr Cartil.* 2018;26(12):1651–7.
98. Tamayo M, Mosquera A, Rego I, Blanco FJ, Gosálvez J, Fernández JL. Decreased length of telomeric DNA sequences and increased numerical chromosome aberrations in human osteoarthritic chondrocytes. *Mutat Res.* 2011;708(1–2):50–8.
99. Martin JA, Buckwalter JA. Telomere Erosion and Senescence in Human Articular Cartilage Chondrocytes. *J Gerontol Biol Sci.* 2001;56(4):172–9.
100. Martin JA, Klingelutz AJ, Moussavi-Harami F, Buckwalter JA. Effects of Oxidative Damage and Telomerase Activity on Human Articular Cartilage Chondrocyte Senescence. *J Gerontol Biol Sci.* 2004;59A(4):324–37.

101. Hirotani H, Ito T. Chondrocyte mitosis in the articular cartilage of femoral heads with various diseases. *Acta Orthop Scand*. 1975;46(6):979–86.
102. Le Graverand M, Sciore P, Eggerer J, Rattner J, Vignon E, Barclay L, et al. Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1808–18.
103. Aigner T, Hemmel M, Neureiter D, Gebhard P, Zeiler G, Kirchner T, et al. Poptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartil. *Arthritis Rheum*. 2001;44(6):1304–12.
104. Xie H, Ma Y, Shao M, Kong J, Zhou T, Wang F, et al. Telomere length in patients with osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Aging Clin Exp Res*. 2022;34(3):495–503.
105. Zhai G, Aviv A, Hunter DJ, Hart DJ, Gardner JP, Kimura M, et al. Reduction of leucocyte telomere length in radiographic hand osteoarthritis: a population-based study. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1444–8.
106. Soto-Hermida Á. Papel de los haplogrupos mitocondriales en la patología artrósica. Influencia de la selección climática [Tesis doctoral]. Galicia: Universidade da Coruña; 2015. Available from: <http://hdl.handle.net/2183/14596>
107. Annesley S, Fisher P. Mitochondria in health and disease. *Cells*. 2019;8(7):680.
108. Zhao Z, Li Y, Wang M, Jin Y, Liao W, Zhao Z, et al. Mitochondrial DNA haplogroups participate in osteoarthritis: current evidence based on a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2020;39:1027–37.
109. Zapico SC, Ubelaker DH. mtDNA mutations and their role in aging, diseases and forensic sciences. *Aging Dis*. 2013;4(6):364–80.
110. Acín-Pérez A, Armstrong J, Attardi G, Bacman S, Bell C, Bennett M, et al. *Mitochondria*. 2ª. Elsevier; 2007.
111. Martin JA, Martini A, Molinari A, Morgan W, Ramalingam W, Buckwalter JA, et al. Mitochondrial electron transport and glycolysis are coupled in

- articular cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 2012;20(4):323–9.
112. Cortés Pereira E. Estudio de regiones génicas relacionadas con el estrés oxidativo. Papel en la artrosis [Tesis doctoral]. Galicia: Universidade da Coruña; 2017. Available from: <http://hdl.handle.net/2183/19453>
 113. Reed KN, Wilson G, Pearsall A, Grishko VI. The role of mitochondrial reactive oxygen species in cartilage matrix destruction. *Mol Cell Biochem.* 2014;397:195–201.
 114. Li H, Slone J, Fei L, Huang T. Mitochondrial DNA Variants and Common Diseases: A Mathematical Model for the Diversity of Age-Related mtDNA Mutations. *Cells.* 2019;8(6):608.
 115. Rego-Pérez I, Durán-Sotuela A, Ramos-Louro P, Blanco FJ. Mitochondrial Genetics and Epigenetics in Osteoarthritis. *Front Genet.* 2020;10:1335.
 116. Caldarazzo Ienco E, Simoncini C, Orsucci D, Petrucci L, Filosto M, Mancuso M, et al. May mitochondrial eve and mitochondrial haplogroups play a role in neurodegeneration and alzheimer's disease? *Int J Alzheimers Dis.* 2011;2011:709061.
 117. Cann R, Stoneking M, Wilson A. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* 1987;325:31–6.
 118. Rego I, Fernandez-Moreno M, Relano S, Arenas J, Blanco FJ. The use of Single Base Extension (SBE) for the assessment of European mitochondrial DNA haplogroups in Galician population. *Open Cell Dev Biol J.* 2008;1:10–6.
 119. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(8):2387–96.
 120. Soto-Hermida A, Fernández-Moreno C, Oreiro N, Fernández-López C, Rego-Pérez I, Blanco FJ. mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *Mitochondrion.* 2014;15:18–23.
 121. Rego I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Gómez-Reino JJ, González A, Arenas J, et al. Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern

- Spain. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:210–3.
122. Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Pértega-Díaz S, Oreiro N, Fernández-López C, Blanco FJ, et al. Mitochondrial DNA haplogroups modulate the radiographic progression of Spanish patients with osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2015;35:337–44.
 123. Fernández-Moreno M, Tamayo M, Soto-Hermida A, Mosquera A, Oreiro N, Fernández-López C, et al. MtDNA haplogroup J Modulates telomere length and Nitric Oxide production. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:283.
 124. Osteoarthritis Initiative [Internet]. [cited 2020 Oct 21]. Available from: www.niams.nih.gov/grants-funding/funded-research/osteoarthritis-initiative
 125. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10):e47.
 126. Raschenberger J, Kollerits B, Ritchie J, Lane B, Kalra PA, Ritz E, et al. Association of relative telomere length with progression of chronic kidney disease in two cohorts: effect modification by smoking and diabetes. *Sci Rep*. 2015 Jul;5:11887.
 127. Zhao Y, Li S, Liu H. Estimating the survival advantage based on telomere length and serum biomarkers of aging. *J Transl Med*. 2017;15(1):166.
 128. Ma H, Zhou Z, Wei S, Liu Z, Pooley KA, Dunning AM, et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(6):e20466.
 129. Willeit P, Willeit J, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Brandstätter A, et al. Telomere Length and Risk of Incident Cancer and Cancer Mortality. *JAMA*. 2010;304(1):69–75.
 130. Watanabe S, Kawamoto S, Ohtani N, Hara E. Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Sci*. 2017;108(4):563–9.
 131. Wang J, Dong X, Cao L, Sun Y, Qiu Y, Zhang Y, et al. Association between telomere length and diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Int Med Res*. 2016;44(6):1156–73.

132. Martin JA, Brown T, Heiner A, Buckwalter JA. Post- traumatic osteoarthritis: The role of accelerated chondrocyte senescence. *Biorheology*. 2004 Jan 1;41(3–4):479–91.
133. Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Oreiro N, Fernández-López C, Pértega S, Cortés-Pereira E, et al. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups influence the progression of knee osteoarthritis. Data from the osteoarthritis initiative (OAI). *PLoS One*. 2014;9(11):e112735.
134. Kenney M, Chwa M, Atilano S, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, et al. Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: Insights into mitochondrial-nuclear interactions. *Hum Mol Genet*. 2014;23(13):3537–51.
135. Révész D, Milaneschi Y, Verhoeven JE, Penninx BWJH. Telomere Length as a Marker of Cellular Aging Is Associated With Prevalence and Progression of Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(12):4607–15.
136. Victorelli S, Passos JF. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine*. 2017;21:14–20.
137. Mangaonkar AA, Patnaik MM. Short Telomere Syndromes in Clinical Practice: Bridging Bench and Bedside. *Mayo Clin Proc*. 2018;93(7):904–16.
138. Liu P, Zhang Y, Ma L. Telomere length and associated factors in older adults with hypertension. *J Int Med Res*. 2019;47(11):5465–74.
139. Blanco F. Osteoarthritis: something is moving. *Reum Clin*. 2014;10(1):4–5.

PUBLICACIONES

Publicaciones asociadas a la tesis doctoral

Guillén R, Otero F, Mosquera A, Vázquez-Mosquera M, Rego-Pérez I, Blanco FJ, Fernández JL. Association of accelerated dynamics of telomere sequence loss in peripheral blood leukocytes with incident knee osteoarthritis in Osteoarthritis Initiative cohort. *Sci Rep*. 2021 Aug 5;11(1):15914.

Guillén R, Otero F, Mosquera A, Rego-Pérez I, Blanco FJ, Fernández JL. Relationship Between the Dynamics of Telomere Loss in Peripheral Blood Leukocytes From Knee Osteoarthritis Patients and Mitochondrial DNA Haplogroups. *J Rheumatol*. 2021;48(10):1603-1607.

Otras publicaciones

Mosquera A, **Guillén R**, Otero F, Rego-Pérez I, Blanco FJ, Fernández JL. Design of a digital-PCR assay to quantify fragmented human mitochondrial DNA. *Environ Mol Mutagen*. 2021;62(6):364-373.

López I, Otero F, **Guillén R**, Fernández MDC, Bou G, Gosálvez J, Fernández JL. Rapid and Accurate Detection of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains Susceptible/Resistant to Cotrimoxazole through Evaluation of Cell Elongation. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(6):720.

Patente

Mosquera A, Blanco FJ, Rego-Pérez I, Fernández JL, Otero F, **Guillén R**. Method for assessing the integrity of a circular DNA molecule. Spain Patent. EP 4 079 865 A1. 2022.



OPEN Association of accelerated dynamics of telomere sequence loss in peripheral blood leukocytes with incident knee osteoarthritis in Osteoarthritis Initiative cohort

Rebeca Guillén^{1,2}, Fátima Otero^{1,2}, Alejandro Mosquera¹, María Vázquez-Mosquera³, Ignacio Rego-Pérez³, Francisco J. Blanco^{3,4,5✉} & José Luis Fernández^{1,2}

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative joint disease, being the main cause of laboral inability. Decreased telomere size in peripheral blood leukocytes (PBL) has been correlated with age-related pathologies, like knee OA. In a dynamic approach, telomere-qPCR was performed to evaluate the relative percentage of PBL telomere loss after a 6-year follow-up, in 281 subjects from the prospective osteoarthritis initiative (OAI) cohort. A radiological Kellgren-Lawrence (KL) grade ≥ 2 was indicative of knee OA. Individuals with knee OA at recruitment ($n = 144$) showed a higher PBL telomere loss after 6 years than those without knee OA at baseline ($n = 137$; $p = 0.018$). Moreover, individuals that developed knee OA during the follow-up ($n = 39$) exhibited a higher telomere loss compared to those that remained without OA ($n = 98$; $p < 0.001$). Logistic regression analysis showed that PBLs telomere loss was not significantly associated with knee OA at recruitment, but behaves as an independent risk factor associated with incidence after follow-up (OR: 1.043; $p = 0.041$), together with maximum KL grade (OR: 3.627; $p = 0.011$), body mass index-BMI (OR: 1.252; $p < 0.001$) and WOMAC-index (OR: 1.247; $p = 0.021$), at recruitment. The telomere decay in PBLs is faster in individuals with incident knee OA, possibly reflecting a systemic-global accelerated aging that enhances the cartilage degeneration.

Abbreviations

BMI	Body mass index
KL	Kellgren-Lawrence
max-KL	Maximum KL grade
OA	Osteoarthritis
OAI	Osteoarthritis initiative
PBL	Peripheral blood leukocytes
qPCR	Quantitative PCR
T/S ratio	Average ratio of telomere repeat copy number to a single gene (36B4) copy number
WOMAC	Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index

Osteoarthritis (OA) is the most common pathology of cartilage and joints, being a major cause of labor inability. Chondrocyte dysfunction possibly related to premature senescence leads to extracellular matrix degradation and local secretion of proinflammatory cytokines^{1,2}.

Telomeres are chromatin structures that cap the end of eukaryotic chromosomes. Human telomere DNA is constituted by a tandem array of the sequence 5'-TTAGGG-3' and the complementary strand 5'-CCCTAA-3'.

¹Genetics Unit, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), A Coruña, Spain. ²Laboratory of Genetics and Radiobiology, Centro Oncológico de Galicia, A Coruña, Spain. ³Rheumatology Division, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), A Coruña, Spain. ⁴Department of Physiotherapy, Medicine and Biomedical Sciences, Strategic Group CICA-INIBIC, Rheumatology and Health Group, Universidad de A Coruña, A Coruña, Spain. ⁵Rheumatology Division, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), As Xubias, 84, 15006 A Coruña, Spain. ✉email: fblagar@sergas.es

		Non-incident (n = 98)	Incident (n = 39)	Prevalent (n = 144)	Total (n = 281)
Age (mean \pm SD)		56.85 \pm 7.52	59.03 \pm 6.97	59.44 \pm 7.04	58.48 \pm 7.27
Gender (n (%))	Female	60 (61.22)	26 (66.67)	66 (45.83)	152 (54.09)
	Male	38 (38.78)	13 (33.33)	78 (54.17)	129 (45.91)
BMI (mean \pm SD)		25.00 \pm 3.54	29.66 \pm 4.28	29.05 \pm 4.35	27.72 \pm 4.53
Hypertension (n (%))	Yes	19 (19.39)	9 (23.08)	45 (31.25)	73 (25.98)
	No	79 (80.61)	30 (76.92)	99 (68.75)	208 (74.02)
Baseline max-KL (n (%))	0	69 (70.41)	11 (28.21)	0 (0.00)	80 (28.48)
	1	29 (29.59)	28 (71.79)	0 (0.00)	57 (20.28)
	2	0 (0.00)	0 (0.00)	78 (54.17)	78 (27.76)
	3	0 (0.00)	0 (0.00)	48 (33.33)	48 (17.07)
	4	0 (0.00)	0 (0.00)	18 (12.50)	18 (6.41)
% PBL telomere loss (mean \pm SD)		27.70 \pm 13.25	38.51 \pm 9.33	34.37 \pm 11.61	32.62 \pm 12.50
WOMAC (mean \pm SD)		0.95 \pm 2.29	3.52 \pm 3.41	9.94 \pm 5.99	3.86 \pm 5.19

Table 1. Characteristics of the cohorts.

Every time a cell replicates the DNA, 50–150 pb of terminal telomeric DNA sequence are lost, so the telomere is progressively shorter with aging, in somatic cells. If a critical size is achieved, replicative senescence is triggered, so the cell stops dividing and may die by apoptosis^{3,4}.

The telomere size from human peripheral blood leukocytes (PBL) decreases with aging. The length of telomeres from leukocytes correlates with that from other somatic tissues from the same subject, independently of their proliferative activity^{5,6}. Telomere length evaluation has been found to be indicative of biological age and a potential predictor of lifespan in human populations⁷. Furthermore, decreased PBL telomere size consistently correlated with increased risk of several common age related pathologies, like cardiovascular diseases, some cancer types, type II diabetes and dementia^{4,8,9}.

It has recently been demonstrated in individuals from the Osteoarthritis Initiative (OAI) consortium from USA that mean PBL telomere size at recruitment was an independent risk factor for concurrent knee OA, as well as radiological severity¹⁰. Furthermore, this baseline PBL telomere length was associated with incident hand OA¹¹.

All the evaluations of PBL telomere size in OA studies were established at a single time-point. Nevertheless, telomere sequences decrease with time. The rates of decay in telomere dynamics could be more informative and relevant than single time-point determinations. The OAI consortium has been prospectively collecting accurate and methodical data during several years of follow-up, including detailed clinical, imaging and analytical parameters¹². This OAI cohort is of choice to try to determine how PBL telomeres evolve in the same individual, in relation to OA.

Results

Cohorts characteristics. 281 individuals (152 women) of Caucasian ancestry were eligible for the study based on availability of both baseline and 72-month radiographs and baseline PBL telomere length data. Mean age was 58.48 \pm 7.27 years. Among the 281 individuals at baseline, 144 met the definition for prevalent knee OA and 137 for non-prevalent (without knee OA). After 6 years of follow-up, those prevalent at baseline continued with knee OA, as is obvious. On the other hand, focusing on those non-prevalent at baseline, after 6 years of follow-up, 39 developed knee OA (incident) whereas 98 continued without knee OA (non-incident) (Table 1).

Prevalent radiographic knee OA. Individuals with prevalent knee OA at recruitment (max-KL \geq 2; n = 144) showed a significant higher relative percentage of PBL telomere loss after 6 years than those without radiographic knee OA at baseline (max-KL < 2; n = 137; median: 35.05 vs 30.44, $p = 0.018$) (Table 2A). Moreover, PBL telomere shortening tended to be faster in males compared to females ($p = 0.094$). No significant differences were observed between individuals with or without hypertension ($p = 0.318$) (Table 2A). A positive correlation was found between PBL telomere loss and BMI ($p = 0.010$) (Table 2B). The correlation between age and PBL telomere decay was near the limit of statistical significance ($p = 0.091$) (Table 2B).

Multivariable analysis by binary logistic regression analysis did not reveal any significant association of age, hypertension and dynamics of PBL telomere loss with prevalent knee OA (Table 3A). Yet, BMI (OR: 1.071; $p = 0.042$), gender (male; OR: 0.577; $p = 0.048$) and Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) (OR: 1.273; $p < 0.001$) manifested as risk factors significantly associated with prevalent knee OA (Table 3A). The three previously identified significant variables, BMI, gender and WOMAC-index, were introduced in the logistic regression model, maintaining their significance (Table 3B).

Incident radiographic knee OA. Regarding incident knee OA, those individuals that developed radiographic knee OA during the 6 years of follow-up period (n = 39), exhibited a higher relative percentage of PBL telomere loss in comparison to those that remained without knee OA (n = 98; median: 41.36 vs 26.25, $p < 0.001$). However, their magnitude of dynamic loss was not significantly different from that of patients with prevalent knee OA (median: 41.36 vs 35.05 $p = 0.142$) (Fig. 1).

			n	Mean	95% CI	Median	P
(A)	Gender	Male	129	33.98	31.68–36.29	35.76	0.094
		Female	152	31.47	29.58–33.35	31.82	
	Hypertension	Non-hypertension	208	32.21	30.54–33.89	32.10	0.318
		Hypertension	73	33.78	30.72–36.85	35.24	
	Baseline max-KL grade	KL < 2	137	30.78	28.55–33.00	30.44	0.018
KL ≥ 2		144	34.37	32.46–36.29	35.05		
(B)	Age (years)	Spearman's Rank Correlation Coefficient					0.091 (r=0.101)
	BMI (Kg/m ²)						0.010 (r=0.153)

Table 2. Evaluation of the relative percentage of telomere loss after 6 years of follow-up, in peripheral blood leukocytes from individuals from the OAI cohort, in relation to parameters obtained at recruitment. (A) Comparisons performed by Mann–Whitney U-test. (B) Correlation analysis.

		Prevalent			Incident		
		OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
(A)	Age (years)	1.030	0.991–1.070	0.134	1.041	0.971–1.115	0.257
	Baseline max-KL grade	–	–	–	3.988	1.420–11.196	0.009
	BMI (Kg/m ²)	1.071	1.002–1.144	0.042	1.266	1.115–1.437	<0.001
	Gender (Male)	0.577	0.334–0.995	0.048	2.534	0.872–7.364	0.088
	Hypertension	1.397	0.746–2.616	0.296	0.518	0.144–1.858	0.313
	% PBL telomere loss	1.011	0.989–1.034	0.313	1.047	1.002–1.094	0.039
	WOMAC	1.273	1.162–1.395	<0.001	1.286	1.065–1.552	0.009
(B)	Baseline max-KL grade	–	–	–	3.627	1.342–9.800	0.011
	BMI (Kg/m ²)	1.082	1.013–1.155	0.019	1.252	1.106–1.417	<0.001
	Gender (Male)	0.558	0.325–0.956	0.034	–	–	–
	% PBL telomere loss	–	–	–	1.043	1.002–1.087	0.041
	WOMAC	1.280	1.164–1.396	<0.001	1.247	1.034–1.505	0.021

Table 3. Prevalent and incident radiographic knee OA: (A) Multivariable analysis using logistic regression analysis to evaluate the association of variables with prevalent and incident knee osteoarthritis. (B) Logistic regression model with selected variables. Significance was defined as $p < 0.05$.

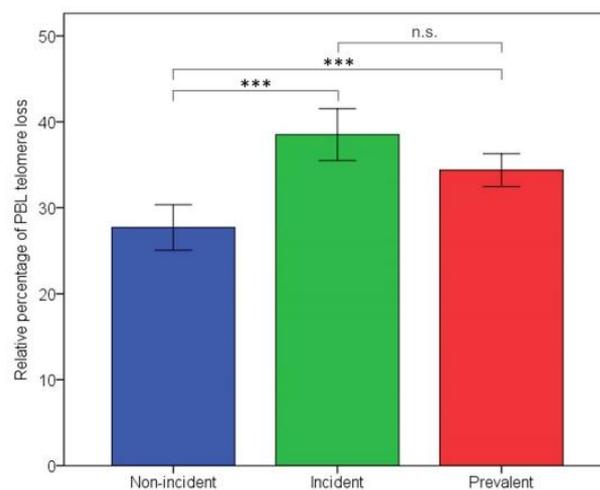


Figure 1. Rate of PBL telomere loss in prevalent, incident and non-incident knee OA. Kruskal–Wallis test evidenced significant differences among the three groups ($p < 0.001$). Incident knee OA exhibited a higher relative fraction of PBL telomere loss in comparison to non-incident OA (mean: 38.51 vs 27.70, Mann–Whitney U-test, $p < 0.001$). Magnitude of dynamic loss was not significantly different between patients with incident and prevalent knee OA (mean: 38.51 vs 34.37, Mann–Whitney U-test, $p = 0.142$). (Significance p value: *** < 0.001 ; n.s.: not significant).

Binary logistic regression analysis evidenced that the dynamics of PBL telomere loss was a significant associated risk factor of incidence of knee OA (OR: 1.047; $p = 0.039$), as well as BMI (OR: 1.266; $p < 0.001$), WOMAC (OR: 1.286; $p = 0.009$) and max-KL grade (OR: 3.988; $p = 0.009$), at baseline (Table 3A). Age, gender and hypertension were not found to be significantly associated. Under the logistic regression model including the four variables previously recognized as significant, PBL telomere decay remained significantly associated with incident knee OA (OR: 1.043; $p = 0.041$) (Table 3B).

Discussion

Assessment of telomeres in PBL provides knowledge about how systemic biological aging is progressing and subsequently may indicate how the articular senescence level is evolving. The present study intended to perform the first evaluation of the dynamics of telomere decay in each individual of the selected cohort. This is a more stringent assessment than the single-time point evaluation and confidently confirms a higher velocity of PBL telomere loss in individuals with prevalent and with incident knee OA.

Although PBL telomere size may be associated with many parameters related to aging and health status, multivariable analysis using logistic regression analysis had evidenced PBL telomere size at recruitment as a risk factor significantly associated to the prevalence of knee OA at baseline¹⁰. Regarding hand OA, the association of PBL telomere amount at recruitment with prevalent hand OA lost significance in the model adjusted for age, sex and BMI, whereas the association was evidenced for incident hand OA¹¹. The results of our dynamic telomere approach were close to those from the single-time point evaluation at baseline regarding hand OA. In fact, the relative percentage of PBL telomere decay did not reach statistical significance as an independent risk factor for prevalent knee OA, whereas it was a significantly associated risk marker of incident knee OA.

It seems paradoxical that the single-time determination of PBL telomeres at recruitment was significantly associated with concurrent knee OA, whereas the dynamic telomere decay did not. Nevertheless, despite the relative percentage of PBL telomere loss in our group of individuals with prevalent knee OA, it was lower than that compared to incident OA, it was higher in comparison with non-incident subjects, although not reaching statistical significance. A relative highly accelerated PBL telomere decay may indicate a rapid progression of biological aging at the systemic level, which locally, at the joint cartilage, may be related to accelerated chondrocyte senescence and subsequent development of knee OA, i.e. incidence. Once the illness is established, the telomeres would be eroded at a lower rate. In fact, the standard PBL telomere decay is not homogeneous throughout life, being more intense during initial years and slowing slightly with aging¹³. Since biological aging may be accelerated in OA, the progressive slowing kinetics could be shifted to earlier chronological ages.

Overall, knee OA is mainly developed in the group of subjects with a higher PBL telomere loss over time, i.e. with an accelerated biological aging phenotype¹⁴. This unfavourable physiological background would enhance chondrocyte senescence, decreasing the cartilage resistance to other mechanic, metabolic, inflammatory or oxidative stressors¹⁵. Some of these stressors may be in connection with risk factors evidenced in the logistic regression analysis, like BMI, which may be linked to obesity. The confluence of all these factors would contribute to the appearance and progression of the articular destruction. This was a retrospective cohort study, limited to a subset of Caucasian subjects and results support a further validation using prospective cohorts. In addition, the sample size of individuals with incident knee OA is not very high, but necessarily related to the natural evolution of the pathology itself after the selection of healthy individuals.

Patients and methods

Subjects. To study the association between radiographic knee OA and telomere length we conducted a cross-sectional and longitudinal analysis of data from a subset of participants in the Osteoarthritis Initiative (OAI). The OAI is a multicenter cohort study of 4,796 adults with or at risk for symptomatic knee OA. Four clinical sites (Memorial Hospital of Rhode Island, The Ohio State University, University of Maryland and Johns Hopkins University, and the University of Pittsburgh) recruited participants between February 2004 and May 2006. Three subcohorts are identified; Progression subcohort, Incidence subcohort, and Non-exposed control subcohort. OAI data and protocols are available for free public access¹². This retrospective cohort study study includes 281 Caucasian individuals (129 male and 152 female) with an age range of 45–78 years (mean 58.48). Subjects included in the study were those whose telomere had already been quantified at baseline and whose results were already published in previous studies^{10,11}. A subset was eligible based on availability of both baseline and 72-month radiographs and baseline PBL telomere length data. The OAI study was approved by the institutional review boards at each OAI clinical site and the coordinating center (University of California, San Francisco) and informed consent was obtained from the participants. This study was also approved by the local Galician Ethics Committee (*Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia*) with registry code 2018/129.

Evaluation of knee OA. X-ray images from both knees were considered in each individual, being evaluated according to the Kellgren-Lawrence (KL) score. KL grade was established for each knee, including patellofemoral and tibiofemoral joints. The KL grade assigned to the subject was the maximum obtained from the evaluation of the two knees, i. e. max-KL grade. *Prevalent radiographic knee OA* was defined when an individual had a maximum KL grade (max-KL) ≥ 2 considering both knees ($n = 144$), at recruitment. *Incident knee OA* was defined when max-KL grade increased from < 2 at recruitment to ≥ 2 after 72-month follow-up ($n = 39$). *Non-incident knee OA* was defined as max-KL grade maintained < 2 after the 72-month follow-up ($n = 98$).

Evaluation of telomere sequences. DNA from PBL was extracted from the blood sample obtained at recruitment and after a 6-year follow-up. Coded DNA samples were processed by research personnel blinded to the status of the subjects. The average telomere amount in PBL was measured with a standard validated quanti-

12. Osteoarthritis Initiative. www.niams.nih.gov/grants-funding/funded-research/osteoarthritis-initiative. Accessed October 21th 2020.
13. Mangaonkar, A. A. & Patnaik, M. M. Short telomere syndromes in clinical practice: bridging bench and bedside. *Mayo Clin. Proc.* **93**(7), 904–916. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.03.020> (2018).
14. Vidal-Bralo, L. *et al.* Specific premature epigenetic aging of cartilage in osteoarthritis. *Aging (Albany NY)*. **8**(9), 2222–2231. <https://doi.org/10.18632/aging.101053> (2016).
15. Blanco, F. J. Osteoarthritis: something is moving. *Reumatol. Clin.* **10**(1), 4–5. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2013.12.001> (2014).
16. Tamayo, M. *et al.* Differing patterns of peripheral blood leukocyte telomere length in rheumatologic diseases. *Mutat Res.* **683**(1–2), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.10.010> (2010).

Acknowledgements

We are grateful to prof. Michael Kjelland for the correction of English style. The work was supported by grants PI17/01987 and PI16/02124 from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Spain, a part of the National Plan for Scientific Program, Development and Technological Innovation, 2013–2016, and the ISCIII-General Subdirection of Assessment and Promotion of Research-European Regional Development Fund (FEDER) ‘A way of making Europe’, and grant IN607A 2021/07 from Xunta de Galicia.

Author contributions

J.L.F. and F.J.B. designed the study and prepared the manuscript draft. R.G. and F.O. performed the experimental work and statistical procedures. A.M., I.R.-P. and M.V.-M. contributed to the design and supervised the statistical analysis. All authors approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.J.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Relationship Between the Dynamics of Telomere Loss in Peripheral Blood Leukocytes From Knee Osteoarthritis Patients and Mitochondrial DNA Haplogroups

Rebeca Guillén Fajardo¹ , Fátima Otero Fariña¹ , Alejandro Mosquera Rey² , Ignacio Rego-Pérez³ , Francisco J. Blanco⁴ , and José Luis Fernández García¹ 

ABSTRACT. Objective. To evaluate the evolution of telomere length from peripheral blood leukocytes (PBLs) in subjects from the Osteoarthritis Initiative (OAI) cohort in relation to the incidence of osteoarthritis (OA), and to explore its possible interactive influence with the mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroup.

Methods. Dynamics of telomere sequence loss were quantified in PBLs from initially healthy individuals (without symptoms or radiological signs), 78 carrying the mtDNA cluster HV, and 47 with cluster JT, from the OAI, during a 72-month follow-up period. The incidence of knee OA during this period ($n = 39$) was radiographically established when Kellgren-Lawrence (KL) score increased from < 2 at recruitment, to ≥ 2 at the end of 72 months of follow-up. Multivariate analysis using binary logistic regression was performed to assess PBL telomere loss and mtDNA haplogroups as associated risk factors of incidence of knee OA.

Results. Carriers of cluster HV showed knee OA incidence twice that of the JT carriers ($n = 30$ vs 9). The rate of PBL telomere loss was higher in cluster HV carriers and in individuals with incident knee OA. Multivariate analysis showed that the dynamics of PBL telomere shortening can be a consistent risk marker of knee OA incidence. Subjects with nonincident knee OA showed a slower telomere loss than those with incident knee OA; the difference was more significant in carriers of cluster JT than in HV.

Conclusion. An increased rate of telomere loss in PBLs may reflect a systemic accelerated senescence phenotype that could be potentiated by the mitochondrial function, increasing the susceptibility of developing knee OA.

Key Indexing Terms: biomarkers, cohort studies, genetic studies, osteoarthritis, polymorphism

Telomeres are essential elements for maintaining genome integrity since they protect the chromosome ends from exonucleolytic degradation and end-to-end fusion.¹ Yet, they progressively

shorten with consecutive cell divisions. When a telomere becomes critically shortened and chromosome capping cannot be properly exerted, cell proliferation is inhibited, and it may enter into apoptosis. This phenomenon is known as replicative senescence and limits cell longevity in most somatic cells.^{1,2}

Because of their relationship with cellular turnover, the quantification of the telomere DNA sequences from peripheral blood leukocytes (PBLs) has been found to be a potential marker of biological age and a predictor of longevity.³ Telomere size from PBLs strongly correlates with that from other tissues from the same individual; thus, its determination may report information about telomere status in less accessible tissues.^{4,5} Telomere size determined in PBLs has been revealed to be a general associated risk factor for age-related chronic diseases, such as some types of cancer, type 2 diabetes mellitus, dementia, and cardiovascular disease.^{2,6,7}

Osteoarthritis (OA) is a common age-related chronic disease defined by confined progressive destruction of articular cartilage, leading to pain and work incapacitation.⁸ Due to chondrocyte dysfunction, the extracellular matrix is degraded, progressing to subchondral bone remodeling, osteophyte formation, local inflammation, degeneration of ligaments, and loss of normal joint function. Chondrocytes release proinflammatory cytokines that contribute to inflammation and promote apoptosis, aggravating the progression of the disease.⁹ OA chondrocytes

The work was supported by grants P117/01987 and P116/02124 from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Spain, a part of the National Plan for Scientific Program, Development and Technological Innovation, 2013–2016, and the ISCIII-General Subdirection of Assessment and Promotion of Research-European Regional Development Fund (FEDER) "A way of making Europe," and grant IN607A 2017/11 from Xunta de Galicia.

¹R. Guillén Fajardo, PhD student, F. Otero Fariña, PhD student, J.L. Fernández García, MD, PhD, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña (CHUAC), Genetics Unit, and Centro Oncológico de Galicia, Laboratory of Genetics and Radiobiology; ²A. Mosquera Rey, PhD, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña (CHUAC), Genetics Unit; ³I. Rego-Pérez, PhD, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña (CHUAC), Rheumatology Division; ⁴F.J. Blanco, MD, PhD, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña (CHUAC), Rheumatology Division, and Universidad de A Coruña, Department of Physiotherapy, Medicine and Biomedical Sciences, Strategic Group CICA-INIBIC, Rheumatology and Health Group, A Coruña, Spain.

The authors declare no conflicts of interest relevant to this article.

Address correspondence to Dr. F.J. Blanco, Rheumatology Division, Hospital Universitario A Coruña (CHUAC) As Xubias, 84, 15006-A Coruña, Spain. Email: fblagar@sergas.es.

Accepted for publication February 10, 2021.

show telomeres shorter than those from healthy individuals; this may be related to accelerated articular senescence and could contribute to the incidence and progression of OA.¹⁰

Mitochondrial genetics also has a significant influence in the pathogenesis of OA. Several studies established associations between specific mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and longevity, particularly with disorders such as hypertension, diabetes, obesity, neurodegenerative diseases, and OA.¹¹ In White populations, mtDNA variants belonging to the mtDNA haplogroup cluster JT have been associated with a reduced risk of prevalence of knee and hip OA and lower rates of incidence and progression of knee OA, in comparison to subjects with the most common haplogroup H.^{12,13,14} Interestingly, individuals carrying the mtDNA haplogroup J exhibit a PBL telomere length longer than non-J carriers.¹⁵

Previous evaluation of subjects from the cohort study belonging to the Osteoarthritis Initiative (OAI) from the United States indicated that PBL telomere size is shorter in patients with concurrent knee OA and in patients with hand OA.^{16,17}

The aforementioned association was found to be even stronger regarding future incidence of hand OA.¹⁷ In the abovementioned studies, all were cross-sectional and PBL telomere size was determined only at the time of recruitment of the patients with OA and controls. However, telomeres decrease progressively with time, with varying rates among individuals. Here we evaluated for the first time, to our knowledge, the evolution of PBL telomere length in subjects from the OAI cohort in relation to the incidence of OA and explore its possible interactive influence with the mtDNA haplogroups.

METHODS

Subjects. The study included individuals from the OAI, from a subsample of controls at recruitment (i.e., without symptoms or radiological signs; $n = 125$, 45 males and 80 females), and carriers of mtDNA cluster HV ($n = 78$) or cluster JT ($n = 47$). The subsample was restricted to White subjects with an age range of 45–77 years (mean 57.6 yrs). Subjects carrying these mtDNA clusters were selected because they constitute the majority of the clusters in the White population and are the most studied and relevant in terms of the incidence and/or progression of OA. Of these subjects, BMI was 26.57 ± 4.36 and 19.2% were hypertensive. The Western Ontario McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC), a clinical measure of disease activity, was also recorded from the OAI database.

Evaluation of knee OA. Individuals were assessed through the use of radiologic knee images, according to the Kellgren-Lawrence (KL) score, ranging from 0 to 4. The interreader agreement between 2 readings was good ($\kappa = 0.70$ – 0.80).¹⁸ The presence of radiographic knee OA was defined when an individual had a maximum KL grade (max-KL) ≥ 2 considering both knees. Incident knee OA was defined when max-KL grade increased from < 2 at recruitment to ≥ 2 at the end of 72 months of follow-up. Baseline and 72 months KL data were obtained from the OAI database.

Evaluation of telomere sequences. DNA from PBLs was extracted from blood samples obtained at recruitment and after a 72-month follow-up. Coded DNA samples were processed by personnel blinded to the status of the subjects. The average telomere amount in PBLs was measured with a standard validated quantitative PCR (qPCR)-based assay as described.¹⁹ This method measures the average ratio of telomere repeat copy number to a single gene (*36B4*) copy number (T/S ratio) in each sample and may be considered an indirect measure of mean telomere length. DNA samples from baseline and after 72 months from the same individual were simultaneously processed

in the same PCR plate to avoid possible interassay variability. The relative percentage of telomere loss in each individual was defined as $[(T/S \text{ ratio at recruitment} - T/S \text{ ratio after 72 months}) / T/S \text{ ratio at recruitment}] \times 100$.

mtDNA haplogroups genotyping. A combination of the single-base extension assay with the PCR-restriction fragment length polymorphism technique was employed to obtain the different single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that characterize the mtDNA haplogroups, as previously described.¹⁹

Statistical analysis. Data were analyzed using SPSS software (IBM Corp.). Since the percentage of PBL telomere loss was not normally distributed, as ascertained by the Kolmogorov-Smirnov test, nonparametric Mann-Whitney *U* test was performed for homogeneity testing. A Pearson chi-square test was used to determine statistical differences between percentages of incidence. Multivariate analysis using binary logistic regression was performed to assess PBL telomere loss, mtDNA haplogroups, age, sex, hypertension, and WOMAC, as associated risk factors of incidence of knee OA. The linearity of relative PBL telomere loss and log odds was confirmed by linear regression ($R^2 = 0.974$). Significance was defined as $P < 0.05$.

Ethics. The OAI study was approved by the institutional review boards at each OAI clinical site and the coordinating center (University of California, San Francisco), and informed consent was obtained from the participants. The study was also approved by the Local Ethics Committee (Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol) with registry code 2018/129.

RESULTS

The study was performed in a group of 78 individuals carrying mtDNA cluster HV and 47 carrying cluster JT, all of them without radiological signs of knee OA at recruitment. The percentage of radiologic OA incidence and the relative percentage of telomere loss in PBLs were evaluated after a follow-up period of 72 months. From the 125 subjects, 39 developed knee OA (i.e., incident).

Regarding mtDNA polymorphisms, individuals with incident knee OA were increased in carriers of cluster HV (38.46%), 2 times higher in comparison with carriers of cluster JT (19.15%; $P = 0.02$). Moreover, the relative percentage of telomere loss in PBLs was significantly lower in subjects carrying cluster JT than in those carrying cluster HV ($P < 0.001$; Figure 1A). The relative PBL telomere shortening was also lower in nonincident subjects than in incident individuals ($P < 0.001$; Figure 1B, Table 1).

In the multivariate analysis of the joint role of both variables (mtDNA cluster and relative PBL telomere shortening), using binary logistic regression, the relative PBL telomere loss remained significantly associated with incidence as a risk marker (OR 1.06, 95% CI: 1.02–1.10, $P = 0.001$); therefore, higher PBL shortening rates were associated with a higher risk of knee OA incidence. The OR is per percentage unit of telomere loss. Otherwise, the mtDNA cluster lost statistical significance (OR 0.70, 95% CI 0.26–1.80, $P = 0.45$; data not shown).

When the analysis was stratified by the cluster, the relative percentage of PBL telomere shortening was significantly higher in the individuals with incident knee OA than in the nonincident knee OA individuals carrying the JT cluster ($P = 0.003$; OR 1.13, 95% CI 1.04–1.22, $P = 0.005$; Figure 1C, Table 1). In carriers of the HV cluster, the differences in PBL telomere shortening rates between nonincident and incident individuals were smaller and extremely close to the limit of statistical significance ($P = 0.08$, OR 1.04, 95% CI 0.99–1.08; Figure 1C, Table 1).

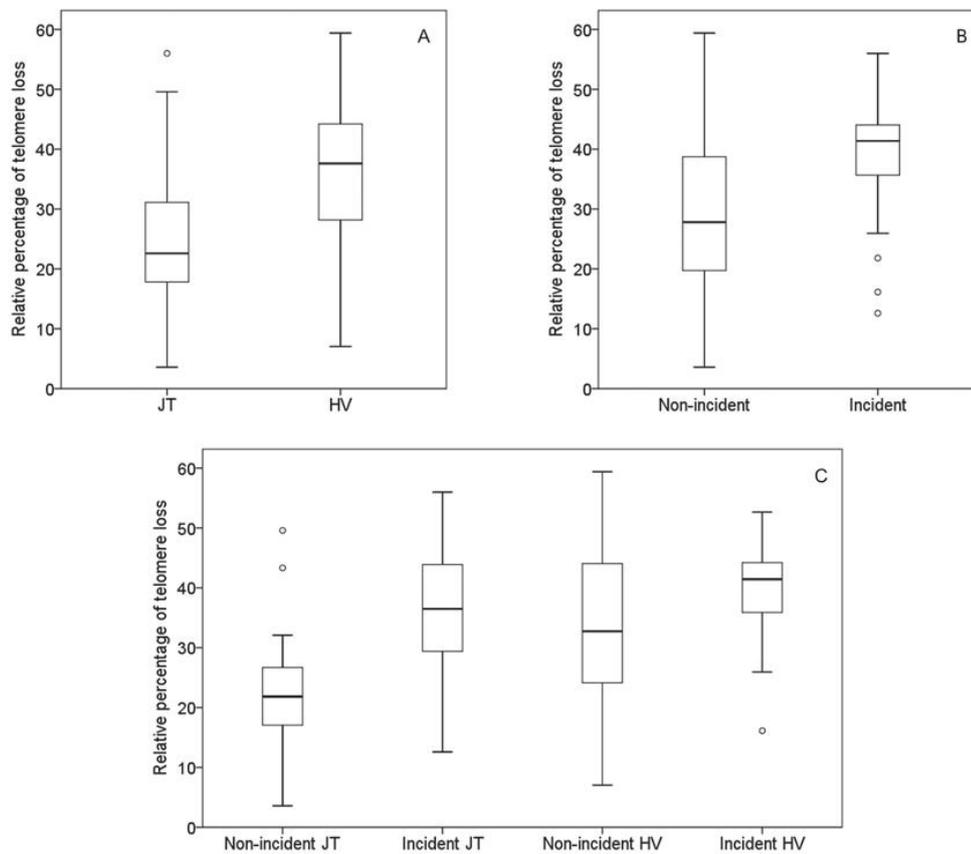


Figure 1. Relative percentage of telomere loss in peripheral blood leukocytes from (A) subjects carrying the mtDNA clusters JT and HV; (B) subjects with nonincident and incident knee OA; and (C) subjects with nonincident and incident knee OA carrying the mtDNA clusters JT and HV. OA: osteoarthritis.

Table 1. Statistical values of the relative percentage of telomere loss in peripheral blood leukocytes and analysis of significant differences in subjects with incident or nonincident knee OA, as well as individuals with mtDNA cluster HV or JT.

		n	Q1	Q2	Q3	P*
Subjects	Nonincident	86	19.39	27.79	39.31	< 0.001
	Incident	39	35.47	41.36	44.22	
mtDNA cluster	HV	Nonincident	48	23.91	32.72	0.08
		Incident	30	35.88	41.43	
	JT	Nonincident	38	16.82	21.83	0.003
		Incident	9	25.60	36.49	

Quartiles (Q1: lower, Q2: median, Q3: upper) are indicated. * Mann-Whitney *U* test. mtDNA: mitochondrial DNA; OA: osteoarthritis.

When age, sex, BMI, WOMAC, and hypertension were included in the multivariate analysis, using binary logistic regression, the relative PBL telomere loss remained significantly associated with incidence (OR 1.05, 95% CI 1.01–1.09, $P = 0.02$), together with BMI (OR 1.26, 95% CI 1.12–1.42, $P < 0.01$) and WOMAC (OR 1.25, 95% CI 1.04–1.50, $P < 0.02$). Age, sex, and hypertension were not significant.

DISCUSSION

In previous reports, reduced PBL telomere length determined at a single timepoint was associated with prevalence of knee OA¹⁶ and with prevalence and incidence of hand OA.¹⁷ Since the telomeres evolve over time, the determination of longitudinal changes of PBL telomeres must provide a more stringent testing. This study confirms the strong association between the dynamics

of PBL telomere shortening with the risk of knee OA incidence. Moreover, mitochondrial function may have a relevant role since the difference in PBL telomere decay between incident and nonincident subjects was more significant in carriers of mtDNA cluster JT than in HV. This fact is due to the much lower percentage of PBL telomere decay in nonincident subjects with cluster JT than with HV.

The polymorphisms (SNPs) that characterize haplogroup cluster JT may decrease the efficiency of mitochondrial coupling, reducing both adenosine triphosphate and reactive oxygen species (ROS) production, as well as lowering the expression of genes related to the inflammatory response, complement, and apoptosis.^{12,20}

Senescent cells accumulate with age and in age-related diseases; they are also associated with loss of tissue function. One main factor associated with the development of knee OA must be the progression of biological aging of the joint cartilage. Replicative senescence at the cellular level is triggered when telomeres are excessively shortened, so this mechanism would be more plausible in high-turnover tissues. Nevertheless, chondrocytes do not exhibit a high proliferation rate and their telomeres are higher than those from PBLs in the same subject.¹⁰ Importantly, telomere DNA damage can occur independently of length, and this has been shown to contribute to the senescent phenotype. Telomeres may act as sensors of intrinsic and extrinsic stresses, and they maintain genomic stability by limiting replication of cells that have accumulated significant genomic damage.²¹ The higher ROS generation in chondrocytes carrying mtDNA cluster HV may damage telomeric DNA, favoring the telomere length-independent senescence, unlike in the less inflammatory and oxidative phenotype from carriers of cluster JT.

The decay of telomeres in PBLs provides information about how this systemic aging process is evolving, and subsequently how the articular senescence status is progressing. Knee OA is mainly developed in the group of subjects with a higher telomere loss over time (i.e., with an accelerated biological aging). The influence of the mtDNA cluster HV or JT on the risk of knee OA incidence seems to be derived from the differential damaging oxidative activity in the body. However, this harmful effect is seen in PBL telomere shortening, as previously mentioned. PBL telomere loss includes the presumed information of the risk of incidence of knee OA provided by the mtDNA cluster, which could explain its loss of significance in the multivariate analysis. Further, the rate of PBL telomere shortening may also provide information concerning other additional risk factors of incidence, independent of mtDNA haplogroup.

The main limitation of this study is that the results are not generalizable to non-White populations. It would be interesting to replicate this in racially diverse samples. In addition, the sample size of the individuals with incident knee OA is not very high. It is a very difficult task to obtain healthy subjects, with 6 years of follow-up, to evaluate the incidence or nonincidence of knee OA. Despite these issues, our results are remarkably consistent with previous epidemiologic studies in this field.

The slower telomere decay in PBL is associated with a lower risk of incidence of knee OA over time. Moreover, this slow

telomere shortening is more significant in nonincident subjects carrying the mtDNA cluster JT than in those with cluster HV. The influence of the mtDNA haplogroup as a risk factor of incidence may be incorporated in the dynamics of PBL telomere shortening.

ACKNOWLEDGMENT

We are indebted to Prof. M.E. Kjelland for his assistance in English language editing.

REFERENCES

1. Tardat M, Dejaridin J. Telomere chromatin establishment and its maintenance during mammalian development. *Chromosoma* 2018;127:3-18.
2. Tumer KJ, Vasu V, Griffin DK. Telomere biology and human phenotype. *Cells* 2019;8:73.
3. Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Peripheral blood leukocyte telomere length and mortality among 64,637 individuals from the general population. *J Natl Cancer Inst* 2015;107:djv074.
4. Takubo K, Aida J, Izumiyama-Shimomura N, Ishikawa N, Sawabe M, Kurabayashi R, et al. Changes of telomere length with aging. *Geriatr Gerontol Int* 2010;10:S197-206.
5. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun* 2013;4:1597.
6. Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest* 2013;123:996-1002.
7. Blackburn EH, Epel ES, Lin J. Human telomere biology: a contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* 2015;350:1193-8.
8. Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:161-9.
9. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23:1233-41.
10. Tamayo M, Mosquera A, Rego I, Blanco FJ, Gosalvez J, Fernandez JL. Decreased length of telomeric DNA sequences and increased numerical chromosome aberrations in human osteoarthritic chondrocytes. *Mutat Res* 2011;708:50-8.
11. Blanco FJ, Valdes AM, Rego-Perez I. Mitochondrial DNA variation and the pathogenesis of osteoarthritis phenotypes. *Nat Rev Rheumatol* 2018;14:327-40.
12. Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Vazquez-Mosquera ME, Cortes-Pereira E, Relano S, Hermida-Gomez T, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence the risk of incident knee osteoarthritis in OAI and CHECK cohorts. A meta-analysis and functional study. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1114-22.
13. Rego-Perez I, Duran-Sotuelo A, Ramos-Louro P, Blanco FJ. Mitochondrial genetics and epigenetics in osteoarthritis. *Front Genet* 2020;10:1335.
14. Zhao Z, Li Y, Wang M, Jin Y, Liao W, Zhao Z, et al. Mitochondrial DNA haplogroups participate in osteoarthritis: current evidence based on a meta-analysis. *Clin Rheumatol* 2020;39:1027-37.
15. Fernandez-Moreno M, Tamayo M, Soto-Hermida A, Mosquera A, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, et al. mtDNA haplogroup J modulates telomere length and nitric oxide production. *BMC Musculoskelet Disord* 2011;12:283.
16. Mosquera A, Rego-Perez I, Blanco FJ, Luis Fernandez J. Leukocyte telomere length in patients with radiographic knee osteoarthritis. *Environ Mol Mutagen* 2019;60:298-301.

17. McAlindon T, Roberts M, Driban J, Schaefer L, Haugen IK, Smith SE, et al. Incident hand OA is strongly associated with reduced peripheral blood leukocyte telomere length. *Osteoarthritis Cartilage* 2018;26:1651-7.
18. NIMH Data Archive. The Osteoarthritis Initiative. [Internet. Accessed July 8, 2021.] Available from: https://nda.nih.gov/oai/study_documentation.html
19. Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Lopez C, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58:2387-96.
20. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, et al. Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: insights into mitochondrial-nuclear interactions. *Hum Mol Genet* 2014; 23:3537-51.
21. Victorelli S, Passos JF. Telomeres and cell senescence - size matters not. *Ebiomedicine* 2017;21:14-20.

ANEXO I

Acuerdo del comité ético para la realización de parte de este trabajo de investigación.



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceio@sergas.es

galicia

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE A CORUÑA-FERROL

Natalia Cal Purriños, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 20/03/2018 el estudio:

Título: Análisis dinámico de parámetros de fisiología telomérica, como marcadores de incidencia y/o progresión de osteoartritis

Promotor: José Luis Fernández García

Tipo de estudio: Otros

Version:

Código del Promotor:

Código de Registro: 2018/129

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y el la Circular nº 07 / 2004, investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros	Investigadores Principales
C.H. Universitario de A Coruña	José Luis Fernández García

Y HACE CONSTAR QUE:

1. El Comité Territorial de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol cumple los requisitos legales vigentes (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y el Decreto 63/2013 por el que se regulan los comités de ética de investigación en Galicia).

2. La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol es:

Lucía Fuster Sanjurjo (Presidenta). Farmacéutica. Especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada Ferrol

Angel Lopez-Silvarrey Varela. (Vicepresidente). Médico especialista en Pediatría. Área de Gestión Integrada A Coruña

Natalia Cal Purriños. (Secretaria). Licenciada en Derecho. Fundación "Profesor Nóvoa Santos". A Coruña

Sonia Pértega Díaz. (Vicesecretaria). Matemática. Área de Gestión Integrada A Coruña

Juana M^a Cruz del Río. Trabajadora social. Consellería de Sanidad

Portal González Lorenzo. Médica especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada Ferrol

Begoña Graña Suárez. Médica especialista en Oncología Médica. Área de Gestión Integrada A Coruña

Carmen Mella Pérez. Médica especialista en Medicina Interna. Área de Gestión Integrada Ferrol

Alejandro Pazos Sierra. Médico. Universidad de A Coruña

Gonzalo Peña Pérez. Médico especialista en Cardiología. Hospital de San Rafael. A Coruña

Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada Santiago

José M^a Rumbo Prieto. Diplomado en Enfermería. Área de Gestión Integrada Ferrol

María Isabel Sastre Gervás. Farmacéutica Atención Primaria. Área de Gestión Integrada A Coruña

Para que conste donde proceda y a petición del promotor / investigador, en A Coruña

La secretaria



Firmado digitalmente por: CAL
PURRIÑOS NATALIA MARIA -
79321490X
Fecha y hora: 27.03.2018
10:53:57

