



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA
SALUD**

FACULTAD DE MEDICINA
CIENCIAS MÉDICAS

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS rs12885300 Y rs225014 DEL GEN
DIO2 CON OSTEOARTRITIS PRIMARIA DE RODILLA EN PACIENTES
MEXICANOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

MATVEY SOSA ARELLANO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. ANTONIO MIRANDA DUARTE
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

MÉXICO, D.F., AGOSTO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

	Pagina
1. Resumen.	I
2. Marco teórico.	1
2.1. Osteoartritis.	1
2.2. Epidemiología.	1
2.3. Clasificación.	2
2.4. Diagnóstico de OA.	3
2.5. Fisiopatogenia de OA de rodilla.	3
2.6. Factores de riesgo.	6
2.7. Gen DIO2.	10
2.8. DIO2 y OA.	12
3. Justificación.	15
4. Planteamiento del problema.	16
5. Pregunta de Investigación.	17
6. Hipótesis.	18
7. Objetivo general.	19

8. Material y métodos.	20
8.1. Diseño.	20
8.2. Población.	20
8.3. Criterios de selección.	20
8.4. Definición de las variables.	21
8.5. Tamaño de la muestra.	22
8.6. Consideraciones éticas.	22
9. Metodología.	23
9.1. Clasificación radiológica.	23
9.2. Genotipificación.	24
9.3. Análisis estadístico.	26
10. Resultados.	27
10.1. Características generales de la muestra obtenida.	27
10.2. Características clínicas y radiológicas de casos y controles.	27
10.3. Distribución genotípica y alélica de los polimorfismos del gen DIO2.	33
11. Discusión.	42

12. Conclusiones.	48
13. Bibliografía.	49
14. Anexos.	62
14.1. A1. Carta de consentimiento.	62
14.2. A2. Formato de recolección de datos.	64
14.3. A3. Formato de datos radiográficos.	67
14.4. A4. Extracción de DNA.	68
14.5. A5. Genotipificación con PCR en tiempo real.	69

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras	Pagina
Figura 1. Vías anabólicas y catabólicas alteradas en el tejido con OA.	5
Figura 2. Factores de riesgo sistémicos y locales para el desarrollo de OA.	7
Figura 3. Estructura del gen <i>DIO2</i> y la proteína DII.	13
Figura 4. Frecuencias relativas de las variables estado civil y escolaridad en casos y controles.	30

Tablas

Tabla 1. Genes asociados con el desarrollo de OA.	11
Tabla 2. Características de las sondas usadas en el ensayo de PCR en tiempo real.	25
Tabla 3. Datos generales de casos y controles.	28
Tabla 4. Antecedentes personales no patológicos de casos y controles.	29
Tabla 5. Antecedentes heredofamiliares de casos y controles.	31

Tabla 6. Antecedentes patológicos de casos y controles.	32
Tabla 7. Características clínicas de casos y controles.	34
Tabla 8. Datos radiológicos reportados en casos y controles.	35
Tabla 9. Frecuencias alélicas y genotípicas de rs225014 y rs12885300 en sujetos con OA y controles.	36
Tabla10. Frecuencias alélicas y genotípicas de rs225014 y rs12885300 en sujetos con alteraciones de la alineación.	38
Tabla 11. Frecuencias alélicas y genotípicas de rs225014 y rs12885300 en sujetos con dolor a la presión ósea.	39
Tabla 12. Frecuencias alélicas y genotípicas de rs225014 y rs12885300 en sujetos con dolor al reposo.	40
Tabla 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de rs225014 y rs12885300 en sujetos con alteraciones patelares.	41

RESUMEN

Introducción: La osteoartritis es la artropatía más frecuente y los polimorfismos de un solo nucleótido rs12885300 y rs225014 del gen *DIO2* se han reportado involucrados con su desarrollo en población inglesa, holandesa y japonesa. No se ha estudiado su asociación en la población mexicana.

Objetivo: Determinar la asociación de rs12885300 y rs225014 con el desarrollo de osteoartritis primaria de rodilla en pacientes mexicanos.

Metodología: Se realizó un estudio de casos y controles no pareados. Los pacientes se clasificaron con la clasificación de Kellgren-Lawrence y se genotipificaron con PCR en tiempo real. Se compararon las frecuencias de los SNP con la presencia de OA de rodilla y otros datos clínicos y radiológicos.

Resultados: Se estudió una muestra de 82 casos y 123 controles. No se encontró asociación entre los SNP con el diagnóstico radiológico de OA. Se encontraron diferencias significativas entre el genotipo TC de rs225014 (OR 1.86, IC95%: 1.01-3.42) con las alteraciones de la alineación, del alelo C (OR 1.72, IC95%: 1.07-2.82) y el genotipo TT (OR 0.21, IC95%: 0.02-0.96) de rs12885300 con dolor a la presión ósea, y el genotipo TT de rs225014 con el dolor al reposo (OR 0.41, IC95%: 0.41-1.05). También hubo diferencias entre el alelo T (OR 2.02, IC95%: 1.21-3.34) y el genotipo TT (OR 2.51, IC95% 1.04-5.84) de rs225014 con las alteraciones patelares.

Discusión: No se encontró relación de los SNP analizados con OA de rodilla. Se encontró asociación de ambos SNP con otras características clínicas y radiológicas. Es conveniente aumentar el tamaño de la muestra para poder corroborar dichas asociaciones.

MARCO TEÓRICO

Osteoartritis.

La osteoartritis (OA) es la enfermedad articular más común. Se caracteriza por degeneración del cartílago articular, remodelación de hueso subcondral y sinovitis leve, lo que puede provocar dolor, crepitación, rigidez articular y discapacidad. Puede afectar distintas articulaciones como rodilla, cadera, manos y pies (Scott y Kowalczyk, 2007).

Epidemiología.

La incidencia de la OA de rodilla es de 240 casos por 100 000 años-persona aumentando después de los 50 años (Oliveria et al., 1995). El riesgo de presentar OA es de aproximadamente 40% en hombres y 47% en mujeres (Murphy et al., 2008). El estudio de Framingham reportó una prevalencia de 19% en personas mayores de 45 años, mientras que el *Johnston County Osteoarthritis Project* reportó una prevalencia del 28% en afroamericanos y en caucásicos (Felson et al., 1987; Jordan et al., 2007). En un estudio transversal realizado en distintos estados de México que incluyó a 17 566 individuos, 1681 tenían el diagnóstico de OA, con una prevalencia de 10.9% en mujeres y 7.3% en hombres; la prevalencia por edad fue de 4.8% en menores de 45 años, 14% en individuos entre 46 y 65 años, y de 21.4% en mayores de 65 años (Rodríguez-Amado et al., 2014). La encuesta nacional de salud de 1998 la reportó como la segunda causa de morbilidad, afectando a 14% de las personas mayores de 60 años (Borges-Yañez y Gomez-Dantes, 1998). En instituciones de salud como el ISSSTE (Instituto de Seguridad y

Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado) la OA representa el 14.8% de la consulta externa siendo la rodilla la articulación más afectada en un 57.6% de los casos (De Pavio-Mota et al., 2005).

Se trata de una enfermedad cosmopolita, aunque existen diferencias étnicas en relación a las articulaciones afectadas; por ejemplo, existe una mayor prevalencia de OA de rodilla en mujeres afroamericanas en comparación con caucásicas, y una menor prevalencia en mujeres chinas comparadas con caucásicas (Zhang et al., 2001; Jordan et al., 2007).

La prevalencia de OA sintomática (datos radiográficos más dolor, rigidez, o molestia articular) es menor: 7-17% en mayores de 45 años (Felson et al., 1987). Sin embargo, ha aumentado la prevalencia de OA sintomática en los últimos 20 años a 4.1% y 6% en mujeres y hombres respectivamente, según el estudio Framingham (Nguyen et al, 2011).

Clasificación.

La OA se puede clasificar como primaria o secundaria. Se considera primaria cuando no se conoce su etiología, en la que se sugiere un componente hereditario importante. Cuando se conoce la causa directa de la OA, como traumatismo directo, procesos mecánicos o quirúrgicos, entre otros, se considera secundaria. (Altman et al., 1986; Herrero-Beaumont et al., 2009).

Diagnóstico de OA.

El diagnóstico de OA es clínico y radiológico. El Colegio Americano de Reumatología hace el diagnóstico con criterios meramente clínicos que incluyen artralgias, edad mayor de 50 años, rigidez, crepitación, hipertrofia articular y ausencia de inflamación (Altman et al., 1986). La clasificación radiológica más usada es la de Kellgren-Lawrence que se basa principalmente en la presencia de osteofitos y estrechamiento del espacio articular (Kellgren y Lawrence, 1957).

Fisiopatogenia de OA de rodilla.

La OA de rodilla se caracteriza principalmente por daño y deformación del complejo articular, más específicamente del cartílago articular (CA) y el hueso subcondral (HS). El CA se encuentra conformado principalmente por condrocitos y por matriz extracelular (MEC) distribuidos en diferentes capas. Debajo de este se encuentra el HS; una zona de hueso epifisiario que incluye la placa de HS, hueso trabecular y hueso subarticular. Estos tejidos mantienen una constante comunicación y tienen la función conjunta de absorber las fuerzas mecánicas a las que se ve sometida la articulación (Goldring y Goldring, 2010; Castañeda et al., 2012).

La MEC es producida por los condrocitos y favorece su unión, es tensa pero flexible, lo que permite una correcta distribución de las fuerzas mecánicas de impacto y a la vez conservar una forma adecuada para permitir la función articular. Está conformada por proteínas como la colágena tipo II, IX y XI, y proteoglicanos como el agregano. Se encuentra en un proceso de modelación y remodelación

constante (Hunter, 2011). Estos procesos son desarrollados por el condrocito al producir las proteínas que componen la MEC y también las enzimas que la remodelan, como las metaloproteinasas (MMPs), y la familia de agrecanasas con dominio de A desintegrina y metaloproteinasas con motivos parecidos a trombospondina (siglas en inglés, ADAMTS). Estos mecanismos son regulados por citocinas catabólicas y anabólicas (Hashimoto et al., 2008).

El condrocito con OA presenta un aumento en el número de células terminalmente diferenciadas e hipertrofia, así como alteraciones en la síntesis de MEC y proliferación celular (Pritzker et al., 2006). Aumenta la expresión de metaloproteasas como MMP-1, -3, -9, -13, -14 y agrecanasas ADAMTS 4, 5, y 9, y disminuye la expresión de moléculas de la MEC (Horton et al., 2006).

El HS también se somete a procesos de modelación y remodelación para poder mantener la forma adecuada del complejo articular. Estos procesos son desarrollados por las células propias del hueso como osteoblastos y osteoclastos (Goldring y Goldring, 2010; Castañeda et al., 2012). La desregulación de las vías que controlan la homeostasis de la articulación conlleva al deterioro de la función de las células y tejidos involucrados; provoca cambios que van desde condromalacia o reblandecimiento del cartílago y HS, pérdida de la continuidad y erosiones, hasta la deformación de la morfología del complejo articular con la formación de osteofitos; provocando OA (Pritzker et al., 2006; Goldring y Goldring, 2010) (figura 1).

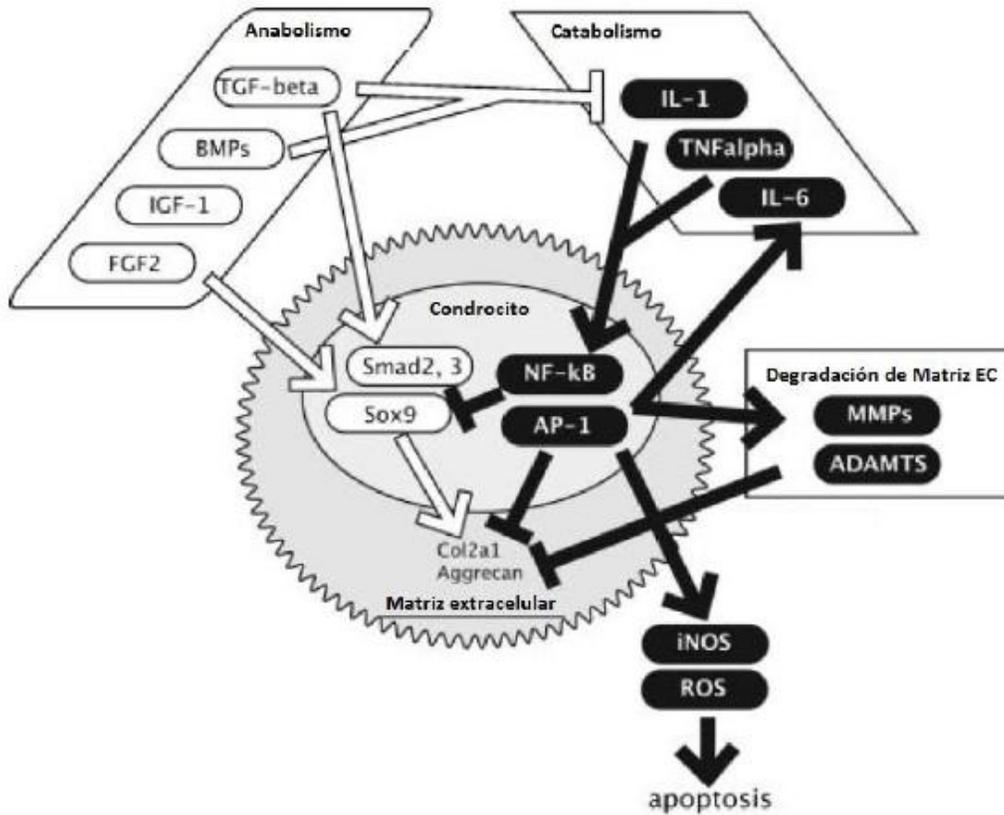


Figura 1. Las vías anabólicas y catabólicas alteradas en el tejido articular en la OA conducen a la degradación y mala distribución de la MEC y la formación de osteofitos. Además la desregulación de las vías catabólicas favorece la apoptosis (modificado de Hashimoto et al., 2008).

Factores de riesgo.

La OA es una enfermedad de etiología multifactorial en la que se encuentran involucrados factores de riesgo que actúan a nivel sistémico y de forma local tales como edad, sexo, obesidad, factores genéticos, actividad física, lesiones directas, defectos de alineación, entre otros (figura 2).

- 1) Edad: es uno de los principales factores de riesgo para OA (Lawrence et al., 2008). Su mecanismo exacto se desconoce, pero puede estar relacionado con la disminución en la capacidad de adaptabilidad de los tejidos al daño mecánico. La edad avanzada se ha relacionado con una menor capacidad ante la respuesta inflamatoria, lo que se asocia con enfermedades como la OA (Goldring y Otero, 2011). También se ha descrito un fenotipo senescente del condrocito el cual es incapaz de reaccionar de forma adecuada a las señales catabólicas y una disminución en su tasa de proliferación celular y aumento de apoptosis (Horton et al., 2006). Además, a través de los años se pueden acumular otros factores de riesgo que favorezcan el desarrollo de la enfermedad (Neogi y Zhang, 2013).
- 2) Sexo: El sexo femenino se asocia a una mayor prevalencia y severidad de la OA (Srikanth et al., 2005). El incremento en la prevalencia e incidencia de OA después de la menopausia sugieren que los estrógenos tienen un rol importante, probablemente relacionado con un incremento en la sensibilidad al dolor. Los resultados de los estudios que valoran la eficacia de los estrógenos como terapia contra la OA son variables (Richette et al., 2003; Hanna et al., 2004).

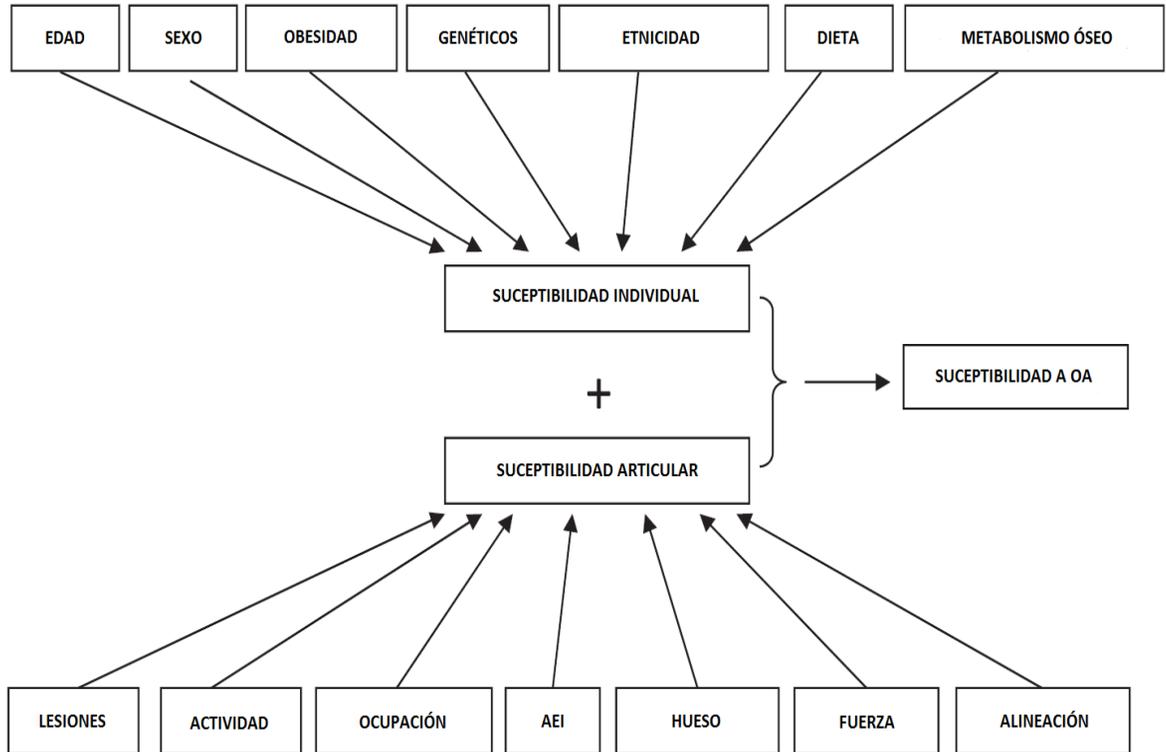


Figura 2. Factores de riesgo sistémicos y locales y su relación con el desarrollo de la OA. Los factores sistémicos favorecen la susceptibilidad del individuo mientras que los locales la susceptibilidad de la articulación. AEI: Asimetría de extremidades inferiores (modificado de Neogi y Zhang, 2013).

- 3) **Obesidad:** Se ha relacionado el alto índice de masa corporal (IMC) como un factor de riesgo tanto sistémico como mecánico (Yusuf, 2012). En el estudio con metanálisis de Blagojevic y colaboradores (2010) se demostró que las personas con sobrepeso u obesidad tienen un riesgo de 2.96 veces mayor que las personas con IMC normal (95% IC 2.56-3.43) (Blagojevic et al., 2010). Incluso, disminuir 2 unidades de IMC en 10 años disminuye 50% el riesgo de desarrollar OA sintomática en mujeres (Christensen et al., 2007).
- 4) **Ocupación:** El uso repetitivo de la articulación predispone a OA, por ejemplo en trabajos que impliquen arrodillarse y ponerse en cuclillas, así como cargar y levantar (Amin et al., 2008; McWilliams et al., 2011).
- 5) **Actividad física:** Ciertos tipos de actividad física se ha asociado como factores de riesgo, sobre todo cuando involucra una carga inadecuada en la articulación. La actividad vigorosa también se ha asociado con OA, por ejemplo deporte de alto rendimiento o la caminata mayor de 10 000 pasos al día (Lane et al., 1998; Wang et al., 2011; Dore et al., 2013).
- 6) **Lesión directa:** Los traumatismos directos que provocan fractura de rodilla, lesiones en los meniscos o de los ligamentos se han asociado a OA (Chapchal, 1978; Edd et al., 2015; Simon et al., 2015).
- 7) **Trastornos de alineamiento:** La mala alineación articular es uno de los predictores más fuertes de progresión de la OA de rodilla. Implica un ciclo vicioso, la OA puede favorecer un defecto de alineación y la mala alineación a su vez favorece el desarrollo de OA, favoreciendo la progresión de la OA (Sharma et al., 2010).

- 8) Inequidad en la longitud de las piernas: Es un defecto modificable quirúrgicamente. El estudio *Johnston County OA Project* reportó que la prevalencia de la OA se duplica en las personas con una desigualdad mayor de 2 cm (Golightly et al., 2010). También se encontraron resultados similares en los pacientes con una desigualdad mayor de 1cm (Harvey et al., 2010).
- 9) Factores genéticos: La historia familiar de OA se ha definido como un factor importante para el desarrollo de la enfermedad (Cooper et al., 1998). En un estudio de agregación familiar en los años 40's, se sugirió un incremento en el riesgo de desarrollo de OA de manos demostrando la herencia de los nódulos de Heberden (Stecher, 1941). Kellgren encontró un riesgo mayor en los parientes de primer grado de los casos afectados (Kellgren et al., 1963). Spector reportó un estudio en gemelos monocigotos y dicigotos donde se demostró una heredabilidad de entre el 40-65% (Spector et al., 1996). Estos estudios han determinado que la OA tiene un componente hereditario importante. Sin embargo, no es sino a partir de estudios de genes candidato y más actualmente a través de estudios amplios del genoma o GWAS, por sus siglas en inglés, como se ha tratado de identificar que genes están involucrados en la OA. De esta forma se ha determinado la asociación de distintos genes con funciones diversas, algunos relacionados con la composición y el mantenimiento de la matriz extracelular, actividad metabólica de los condrocitos, o implicados con la regulación de la densidad y la masa ósea (Loughlin et al., 2000; Ikeda et al.,

2002; Zhai et al., 2004; Fytili et al., 2005; Valdes et al., 2007; Day-Williams et al., 2011; Evangelou et al., 2011; Valdes et al., 2011; arcOGEN, 2012; Borgonio-Cuadra et al., 2012; Claessen et al., 2012; Raine et al., 2012; Song et al., 2014; Zhang et al., 2015) (tabla 1).

Gen *DIO2*.

El gen *DIO2* se localiza en 14q32.11, se extiende 8.1 kb, tiene 2 exones y en sus regiones no traducidas (tanto 3' como 5') tiene distintas secuencias reguladoras (Celi et al., 1998, Bartha et al., 2000). Codifica para una selenoproteína deiodinasa de iodotironina Tipo II (DII) que contiene un pliegue tioredoxina (TRX) donde se localiza el aminoácido raro selenocisteína, capaz de catalizar la reducción por deshalogenización de la hormona tiroidea tiroxina (T4) transformándola a su forma más activa, triiodotironina (T3) en el citosol (Ohba et al., 2001; Gereben et al., 2008,).

La proteína DII juega un papel importante en la etapa de crecimiento y desarrollo de la placa de crecimiento articular. Durante el desarrollo del cartílago, los condrocitos producen indian hedgehog (Ihh), una proteína importante para el desarrollo de los vertebrados que estimula la actividad de WSB1 (Proteína que contiene una caja SOCS y repetidos WD, es una subunidad de ligasa de ubiquitina inducible por SHh) que se expresa en los condrocitos pericondriales (Kronenberg, 2003). WSB1 inactiva a DII al ubiquitinizarla lo que provoca un hipotiroidismo intracelular que favorece la expresión de *PTHrP* (Proteína relacionada con Hormona Paratiroidea) que permite la proliferación celular y limita la hipertrofia,

Tabla 1. Genes asociados con en el desarrollo de OA en estudios de genes candidato y GWAS.

Gen	Polipéptido	Chr	OR
<i>COL2A1</i>	Cadena α 1 de colágena tipo II	12q12 – q13.1	1.6 a 5.5
<i>GDF5</i>	Factor de Diferenciación y Crecimiento 5	20q11.22	1.12 a 1.23
<i>VDR</i>	Receptor de vitamina D	12q12 – q13.1	1.10 a 3.15
<i>ER</i>	Receptor de estrógenos	6q22.3 – q23.1	1.01 a 6.02
<i>AR</i>	Receptor de andrógenos	Xq11 – q12	0.01 a 0.70
<i>IGF -1</i>	Factor de crecimiento tipo insulina 1	12q21.3	1.5 a 3.6
<i>ASPN</i>	Asporina	9q21.3-q22	1.0 a 2.61
<i>MCF2L</i>	Guanine nucleotide exchange factor DBS	13q34	1.11 a 1.23
<i>DUS4L</i>	Dihydrouridine synthase 4-like	7q22	1.11 a 1.24
<i>FTO</i>	Fat mass and obesity-associated protein	16	1.07 a 1.15
<i>CHST11</i>	Chondroitin 4-sulfotransferases	12	1.09 a 1.18
<i>KLHDC5;PTHLH</i>	kelch-like family member 42	12	1.09 a 1.20
<i>ASTN2</i>	Astroctatina 2	9	1.13 a 1.27
<i>FILIP1;SENP6</i>	Sentrin specific peptidase 6	6	1.12 a 1.25
<i>SUPT3H;CDC5L</i>	Cell división cycle 5-like	6	1.09 a 1.20
<i>TP63</i>	Tumor protein p63	3	1.13 a 1.29
<i>GLT8D1;GNL3</i>	Guanine nucleotide binding protein-like 3	3	1.08 a 1.16
<i>DIO2</i>	Deiodinasa de Iodotironina tipo II	14q3	1.37 a 2.34

Chr: Locus cromosómico; OR: razón de momios.

degradación y mineralización de la matriz extra celular a los condrocitos de las capas más profundas de la placa cartilaginosa (Dentice et al., 2005; Adams et al., 2007; Wang et al., 2010). Esto se relaciona con el hecho de que la actividad de la hormona tiroidea favorece el proceso de diferenciación del condrocito e inhibe su proliferación (Robson et al., 2000).

***DIO2* y OA.**

Un reporte reciente de un estudio amplio del genoma ha propuesto al gen *DIO2* como un nuevo *locus* de susceptibilidad para el desarrollo de OA. Este estudio se realizó en una población del Reino Unido, y se pudo replicar en pacientes del estudio Rotterdam y en una población japonesa, confirmando la asociación del haplotipo conformado por los polimorfismos rs225014 y rs12885300 del gen *DIO2*. Al analizar los datos en conjunto de los tres estudios se obtuvo una OR= 1.79 (IC 95%= 1.37 - 2.34) y una $p = 2.02 \times 10^{-5}$ (Meulenbelt et al., 2008).

El polimorfismo rs225014 (T>C) es un cambio de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) funcional que provoca un cambio de sentido en el exón 2 del gen *DIO2* que se traduce en el cambio de aminoácido Thr92Ala; mientras que el SNP rs12885300 (C>T) se encuentra localizado en la región no traducida 5' del gen en ORF-A (un pequeño marco de lectura abierto que interfiere con la traducción), por el cambio de aminoácido que provoca se denomina D2-ORFA-Gly3Asp (Gereben et al., 2008) (figura 3).

Estudios acerca del papel funcional que juega la proteína DII en el cartílago articular y su relación con OA han tenido resultados diversos. Waarsing y

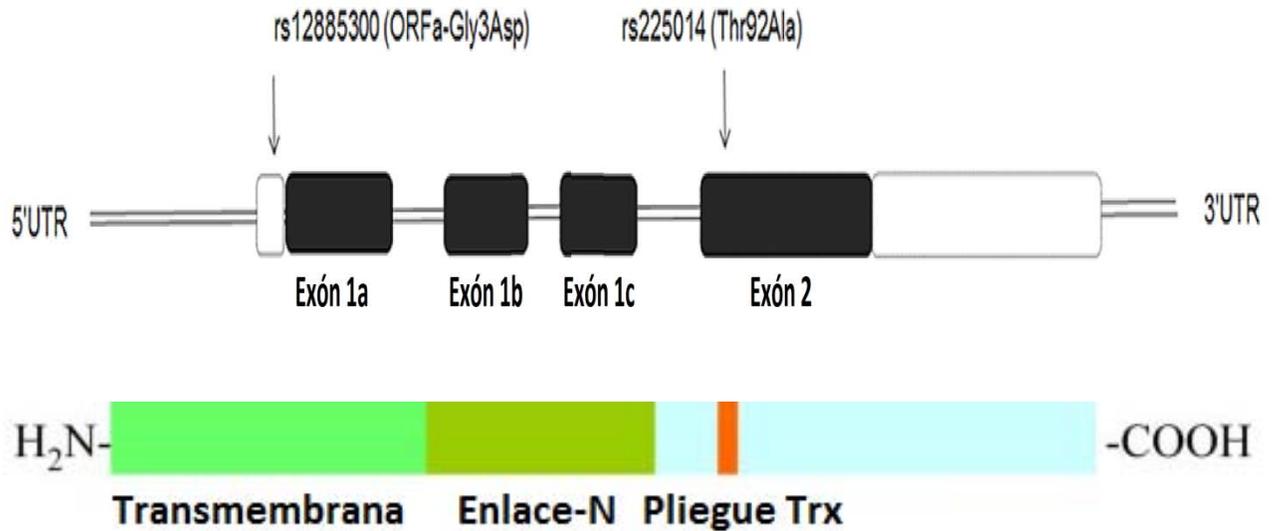


Figura 3. Estructura del gen *DIO2* y de la proteína DII. Se observa localización de los polimorfismos rs12885300 y rs225014; el primero se localiza en un marco de lectura abierto, mientras que el segundo es un polimorfismo funcional que cambia una timina por una citosina en el exón 2 lo que se traduce en un cambio de treonina por alanina en la estructura proteica. Los exones 1b y 1c son regiones del intrón que se traducen en ciertas isoformas cuya expresión fue descubierta en la glándula pituitaria. La proteína DII tiene un dominio transmembrana, una región de enlace para formar homodímeros y un pliegue Trx donde se encuentra el sitio activo y el aminoácido selenocisteína (modificado de Leiria et al, 2014; y Lu y Holmgren, 2009).

Colaboradores (2011) reportaron en hermanos afectados con OA que el polimorfismo rs12885300 se relaciona con OA de la cadera y su consecuente desgaste articular (Waarsing et al., 2011). Se ha sugerido también, en estudios de transfección de SiRNAs en condrocitos humanos primarios, que la supresión de *DIO2* favorece la sobreexpresión de IL1B favoreciendo un estado pro-inflamatorio (Cheng et al., 2012). Mientras que Nagase y colaboradores (2013), reportaron un incremento en la expresión de *DIO2* en el cartílago articular de pacientes con OA comparado con controles, y que este incremento en la expresión favorece la hipertrofia condrocitaria y la respuesta inflamatoria a través de la mediación de IL1B por T3 en el tejido articular de ratas transgénicas de *DIO2* específico en cartílago (Nagase et al., 2013). Otros investigadores han reportado un desbalance en la expresión alélica del tejido articular afectado por OA, donde los alelos del polimorfismo rs225014 tienden a expresarse más en el cartílago de áreas afectadas que en zonas no afectadas (Bos et al., 2012).

JUSTIFICACIÓN

La OA es una enfermedad altamente incapacitante que generalmente afecta a la población mayor de 40 años, muchos de los afectados aún son personas productivas. En el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) es una de las entidades que se presentan con mayor frecuencia ocupando el tercer lugar como causa de atención.

Debido a la alta frecuencia con que se presenta esta entidad es necesario el estudio de asociación con genes probablemente implicados en la enfermedad y conocer cuáles de ellos se presenta en nuestra población. Una vez determinadas las asociaciones se podrá continuar con investigaciones que determinen los mecanismos mediante los cuales intervienen tales factores en el desarrollo de la OA. Por otra parte, el éxito de programas sobre prevención se verá aumentado de forma importante si se toman medidas sobre aquello que incrementa el riesgo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La OA es una enfermedad frecuente en la cual se han descrito diferentes factores de riesgo tales como obesidad, edad, actividad física entre otros. Se ha sugerido que los factores genéticos juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad debido a la observación de los riesgos incrementados en familiares de pacientes con OA y la alta concordancia de la enfermedad en estudios de gemelos. Debido a esto se ha estudiado la relación de algunos genes con el desarrollo de OA pero los resultados han sido controversiales.

Un gen poco estudiado es *DIO2*, el cual codifica a la Deiodinasa de Iodotironina Tipo II, una selenoproteína encargada de la conversión de T4 a T3 de forma intracelular en el condrocito. Aun cuando se ha demostrado la asociación de los polimorfismos rs12885300 y rs225014 de este gen con OA en distintas poblaciones son pocos los reportes en la literatura que lo documentan; además, esta asociación no se ha estudiado en la población mexicana. Es por esto que nos preguntamos si esta existe.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación de los polimorfismos rs12885300 y rs225014 del gen *DIO2* con el desarrollo de osteoartritis primaria de rodilla en pacientes mexicanos?

HIPÓTESIS

Los polimorfismos rs12885300 y rs225014 del gen *DIO2* se encuentran asociados con el desarrollo de osteoartritis primaria de rodilla en pacientes mexicanos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación de los polimorfismos rs12885300 y rs225014 del gen *DIO2* con el desarrollo de osteoartritis de rodilla en pacientes mexicanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño.

Estudio de casos y controles.

Población.

Pacientes que acudieron al INR con diagnóstico de OA de rodilla incluyendo casos prevalentes y casos incidentes. Los casos prevalentes fueron aquellos en los que el diagnóstico se realizó antes del inicio del estudio, que continuaban acudiendo a la consulta y cumplieron con los criterios para ingresar al estudio. Los casos incidentes fueron aquellos cuyo diagnóstico se realizó a partir del inicio del estudio y que cumplieron con los criterios para ingresar al estudio.

Criterios de selección de la muestra.

Criterios de inclusión de los casos:

- Masculino o femenino.
- Diagnóstico clínico de OA de rodilla.
- Con una clasificación radiológica de Kellgren y Lawrence ≥ 2 .
- Con un índice de masa corporal ≤ 29 .
- Tener 40 años o más al momento de diagnóstico de la OA.
- Diagnóstico de OA establecido o confirmado en el INR.

Criterios de exclusión de los casos:

- Antecedentes de traumatismos severos en rodilla.
- Enfermedades congénitas o del crecimiento.
- Otras enfermedades articulares y óseas; por ejemplo, artritis reumatoide.

Criterios de inclusión de los controles:

- Masculino o femenino.
- Tener 40 años o más al momento del inicio del estudio.
- Sin diagnóstico de OA de rodilla.
- Escala de Kellgren y Lawrence < 2.

Criterios de exclusión de los controles:

- Enfermedades congénitas o del crecimiento.
- Otras enfermedades articulares y óseas; por ejemplo, artritis reumatoide.

Definición de las variables.

Variable dependiente: Osteoartritis primaria de rodilla clasificada radiológicamente con la escala de Kellgren-Lawrence.

Variable independiente: Genotipo de los polimorfismos rs225014 y rs12885300 determinado por PCR en tiempo real.

Tamaño de muestra.

El cálculo se realizó con la fórmula para diseños de casos y controles no pareados con un control por caso (Schlesselman, 1982), tomando en cuenta la prevalencia del polimorfismo rs225014 del gen *DIO2* reportados previamente en población del Reino Unido, holandeses y japoneses (Meulenbelt et al., 2008). Tomando en cuenta los parámetros para frecuencia en controles de 55%, OR de 1.8, error alfa de 0.05, y un poder estadístico de 80%, se consideró necesario estudiar dos grupos de 195 individuos.

Consideraciones éticas.

Aunque la toma de muestra sanguínea confiere un riesgo mínimo, para incluir a los casos se procedió a entrevistar a los pacientes para invitarlos a participar y sólo se incluyeron cuando dieron su consentimiento en forma libre e informada. Se explicó de forma sencilla y comprensiva la naturaleza del estudio y la necesidad de la toma de muestra sanguínea, no se ejerció ningún tipo de presión para convencerlos de su colaboración. Quienes aceptaron participar en el estudio firmaron una carta de consentimiento diseñada previamente (Anexo I). Asimismo, cuando se detectó un probable control se procedió de la misma forma que con los casos, y sólo quienes aceptaron participar ingresaron al estudio, sin intervenir en su decisión y firmando la carta de consentimiento.

METODOLOGÍA

Clasificación radiológica de los sujetos de estudio.

Se incluyeron a los pacientes que previo consentimiento informado aceptaron participar en el estudio. Se les interrogó para la obtención de datos generales, antecedentes, datos clínicos (Anexo 2), se obtuvo una muestra de sangre periférica de aproximadamente 5 ml y se realizó una radiografía de rodilla. Esta se clasificó por un médico radiólogo de acuerdo a los criterios propuestos por Kellgren y Lawrence (1957) en todos los sujetos (Anexo 3). Los datos radiológicos considerados como evidencia de OA fueron:

1. Formación de osteofitos en las márgenes articulares, o en el caso de la rodilla en la espina tibial.
2. Huesecillos periarticulares.
3. Estrechamiento del cartílago articular asociado a esclerosis del hueso subcondral.
4. Áreas pseudoquísticas pequeñas con paredes escleróticas situadas de ordinario en el hueso subcondral.

Graduación de la osteoartritis:

Grado 0 (Ausente): Sin alteraciones

Grado 1 (Dudosa): Disminución dudosa del espacio articular y osteófitos posibles en los bordes

Grado 2 (Mínima): Osteófitos definitivos y disminución posible del espacio articular

Grado 3 (Moderada): Osteófitos múltiples moderados, disminución definitiva del espacio articular y cierta esclerosis y deformación ósea terminal posible

Grado 4 (Intensa): Grandes osteófitos, disminución acentuada del espacio articular, esclerosis intensa y deformación ósea terminal definitiva.

Genotipificación de los individuos.

Se extrajo DNA de leucocitos de sangre venosa periférica, con el empleo del kit de extracción Puregene Blood Core Kit B (Quiagen, Valencia, California, USA) (Anexo 4). Se diseñaron primers específicos para el gen *DIO2* y se usaron sondas TaqMan de los polimorfismos rs225014 y rs12885300 para genotipificar las muestras por medio de la técnica PCR en tiempo real. Cada sonda se tiñó con un fluoróforo de distinto color (C con VIC y T con FAM en ambos SNP) (tabla 2). Para la reacción utilizamos un kit de genotipificación con sondas TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) y un termociclador Rotor-Gene Q (Quiagen, Germantown, Maryland, USA) (Anexo 5). Los pacientes se clasificaron en grupos C-C, C-T, y T-T de acuerdo al genotipo reportado para cada polimorfismo en el análisis.

Tabla 2. Características de las sondas utilizadas.

Polimorfismo	Iniciadores [sonda] iniciador
<i>rs225014</i>	(TTGCCACTGTTGTCACCTCCTTCTG[C/T]ACTGGAGACATGCACCACACTGGAA)
<i>rs12885300</i>	(GCAGAGATTTTAAAATTTTCTTAG[C/T]CTTTCATTGTCTCTATGCTCTTTAA)

Sonda de alelo C teñida con fluoroforo VIC y alelo T teñida con FAM en ambos SNP.

La genotipificación con sondas TaqMan tiene como fundamento el hecho de que estas sondas en su estructura contienen un fluoróforo y un inhibidor del mismo o "quencher". Al unirse por complementariedad de bases a la variante alélica de interés en el DNA de una sola cadena el "quencher" inhibirá la liberación del fluoróforo hasta que una DNA polimerasa separe de la cadena a la que se encuentra adherido lo cual permite la liberación de fluorescencia que podrá ser detectada por un equipo de PCR en tiempo real, indicando la amplificación de dicho alelo.

Análisis estadístico.

Se realizó estadística descriptiva y se determinaron las diferencias entre las características individuales entre los grupos con el test de Student para las variables continuas y U de Mann Withney o chi-cuadrada (χ^2) para las variables categóricas y dicotómicas según su caso. El Software estadístico que usamos fue STATA 10.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA). Se midieron frecuencias alélicas y equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se realizó un análisis de regresión logística no condicional, estimando la razón de momios para la asociación del polimorfismo en el gen *DIO2* a través del exponencial de los coeficientes de regresión en forma univariada y multivariada. Para formar el modelo multivariado se probaron las variables que en el análisis univariado mostraron un valor de $p \leq 0.15$. El nivel de significancia α fue de 0.05.

RESULTADOS

Características de la muestra obtenida.

Se incluyeron 205 sujetos de estudio, 82 casos y 123 controles. El 80.49% de los casos fueron mujeres mientras que en el grupo control fueron un 77.24%. Se observó una diferencia significativa respecto a la edad entre casos y controles (67.1 ± 9.9 y 55.7 ± 10.9 años, respectivamente; $p=0.001$). No se encontró una diferencia significativa en el Índice de Masa Corporal (IMC) entre ambos grupos (tabla 3).

En cuanto a los antecedentes no patológicos se encontraron diferencias significativas entre casos y controles en variables como menopausia (96.9% vs 75.8%, $p=0.001$), ocupación actual (34.15% vs 57.75%, $p=0.001$; distinguimos entre trabajo doméstico de otras formas de trabajo) y escolaridad ($p=0.042$) (tabla 4 y figura 4).

También se encontraron diferencias significativas en cuanto al antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2 (54.88% vs 73.98; $p=0.005$) y en enfermedades concomitantes como hipertensión arterial sistémica (46.3% vs 19.5%; $p=0.001$) (tablas 5 y 6).

Características clínicas y radiológicas de casos y controles.

Los principales datos clínicos de afectación de la rodilla reportados fueron crepitación (86.59% vs 59.35%, casos y controles respectivamente; $p=0.001$), dolor al movimiento (80.49% vs 62.6%; $p=0.006$), alteraciones de la alineación de

Tabla 3. Datos generales de casos y controles.

Características	Casos n=82 (%)	Controles n=123 (%)	p
<i>Sexo (m/h)</i>	66 (80.49)/16 (19.51)	95 (77.24)/28 (22.76)	0.578
<i>Edad (media±DS)</i>	67.1±9.9	55.7±10.9	0.001
<i>IMC (media±DS)</i>	25.6±2.5	25.5±2.5	0.947
<i>Grado radiológico (Kellgren-Lawrence)</i>			
<i>G0 n(%)</i>	0	70 (56.91)	-
<i>G1 n(%)</i>	0	53 (43.09)	-
<i>G2 n(%)</i>	36 (43.90)	0	-
<i>G3 n(%)</i>	32 (39.03)	0	-
<i>G4 n(%)</i>	14 (17.07)	0	-

IMC: Índice de Masa Corporal (kg/m²); valor de p calculado con X² en tablas de contingencia de 2x2.

Tabla 4. Antecedentes personales no patológicos de casos y controles.

Características	Casos n=82 (%)	Controles n=123 (%)	p
<i>Tabaquismo</i>	15 (18.3)	35 (28.5)	0.096
<i>Alcoholismo</i>	19 (23.2)	41 (33.3)	0.117
<i>Menopausia</i>	64 (96.9)	72 (75.8)	0.001
<i>Ocupación Actual</i>	28 (34.15)	71 (57.72)	0.001
<i>Deporte actual</i>	24 (29.27)	29 (23.58)	0.362
<i>Deporte previo</i>	46 (56.10)	72 (58.54)	0.729

Valor de p calculado con X^2 en tablas de contingencia de 2x2.

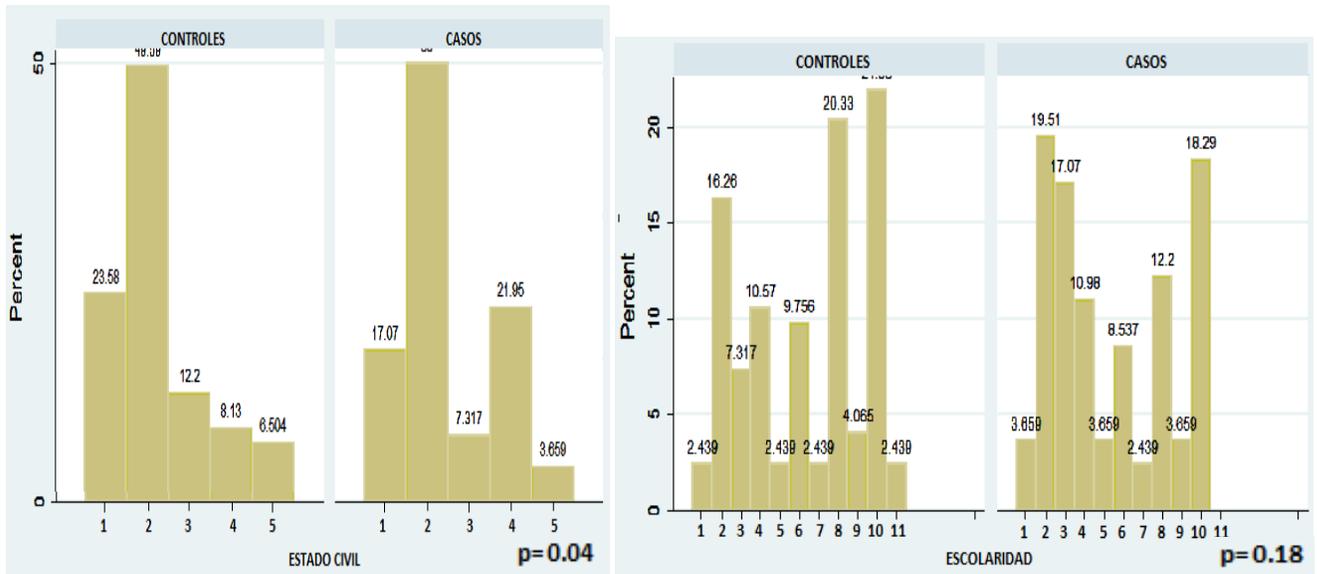


Figura 4. Frecuencias relativas de las variables estado civil (1: soltero, 2: casado, 3: divorciado, 4: viudo, 5: unión libre) y escolaridad (1: sin estudios, 2: primaria completa, 3: primaria incompleta, 4: secundaria completa, 5: secundaria incompleta, 6: preparatoria completa, 7: preparatoria incompleta, 8: estudios superiores completos, 9: estudios superiores incompletos, 10: otros estudios completos, 11: otros estudios incompletos) en casos y controles. Valor de p calculado con U de Mann-Whitney. Se analizó la asociación de escolaridad con OA al encontrarse en relacionada con la ocupación.

Tabla 5. Antecedentes heredofamiliares de casos y controles.

Características	Casos n=82 (%)	Controles n=123 (%)	p
<i>Osteoartritis</i>	41 (50.7)	63 (51.2)	0.864
<i>Hipertensión arterial sistémica</i>	44 (53.66)	73 (59.35)	0.420
<i>Cardiopatía</i>	22 (26.83)	33 (26.83)	1.000
<i>Diabetes mellitus tipo 2</i>	45 (54.88)	91 (73.98)	0.005
<i>Cáncer</i>	39 (47.56)	66 (53.66)	0.392

Valor de p calculado con X^2 en tablas de contingencia de 2x2.

Tabla 6. Antecedentes patológicos de casos y controles.

Características	Casos n=82 (%)	Controles n=123 (%)	p
<i>Diabetes mellitus tipo 2</i>	18 (21.9)	15 (12.2)	0.063
<i>Hipertensión arterial sistémica</i>	38 (46.3)	24 (19.5)	0.001
<i>Cardiopatía</i>	8 (9.76)	6 (4.88)	0.175
<i>Hipercolesterolemia</i>	31 (37.80)	42 (34.15)	0.592
<i>Cáncer</i>	3 (3.66)	7 (5.69)	0.508

Valor de p calculado con X^2 en tablas de contingencia de 2x2.

rodilla (56.1% vs 27.64%; $p=0.001$), inestabilidad (54.88% vs 41.46%; $p=0.059$) y rigidez articular matutina (41.46% vs 26.02%; $p=0.020$). También se encontraron diferencias significativas entre grupos en variables como crecimiento óseo (25.61% vs 8.94%; $p=0.001$), derrame articular (6.10% vs 0.81%, $p=0.028$) y limitación al movimiento (24.39% vs 9.72%; $p=0.005$) (tabla 7).

Se analizaron las diferencias entre los datos radiológicos entre ambos grupos encontrando diferencias significativas en la presencia de osteofitos (95.15% vs 0.00%; $p<0.001$, casos y controles respectivamente) y estrechamiento articular (85.37% vs 63.93%; $p=0.001$) (tabla 8).

Distribución genotípica y alélica de los polimorfismos del gen *DIO2*.

Se valoraron las frecuencias genotípicas y alélicas de rs225014 y rs12885300, así como sus diferencias entre casos y controles. Para el análisis de rs12885300 se excluyó un sujeto control por problemas de genotipificación. Ambos polimorfismos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control (rs225014 $p=0.32$; rs12885300 $p=0.72$). No se encontraron diferencias significativas con respecto a las frecuencias analizadas entre sujetos con OA y sujetos controles en el análisis de una sola vía ni al ajustar los valores con las variables edad, hipertensión arterial, alteraciones de la alineación y crepitación en la regresión logística (tabla 9).

Se exploraron las frecuencias alélicas y genotípicas de ambos polimorfismos y su relación con otras variables clínicas encontrando algunas tendencias significativas. Las alteraciones de la alineación mostraron asociación con el genotipo TC del

Tabla 7. Características clínicas de casos y controles.

Características	Casos n=82 (%)	Controles n=123 (%)	p
<i>Dolor movimiento</i>	66 (80.49)	77 (62.60)	0.006
<i>Dolor reposo</i>	32 (39.02)	37 (30.08)	0.184
<i>Inestabilidad</i>	45 (54.88)	51 (41.46)	0.059
<i>RAM</i>	34 (41.46)	32 (26.02)	0.020
<i>Alteraciones de la alineación</i>	46 (56.10)	34 (27.64)	0.001
<i>Genu valgo</i>	28 (34.15)	28 (22.76)	0.073
<i>Genu varo</i>	20 (24.39)	6 (4.88)	0.001
<i>Crecimiento óseo</i>	21 (25.61)	11 (8.94)	0.001
<i>Laxitud ligamentaria</i>	3 (3.66)	4 (3.25)	0.875
<i>Dolor a la presión</i>	34 (41.46)	45 (36.59)	0.482
<i>Crepitación</i>	71 (86.59)	73 (59.35)	0.001
<i>Derrame articular</i>	5 (6.10)	1 (0.81)	0.028
<i>Limitación al movimiento</i>	20 (24.39)	12 (9.76)	0.005
<i>Calor local</i>	9 (10.98)	14 (11.38)	0.928

RAM: Rigidez articular matutina; valor de p calculado con X^2 en tablas de contingencia de 2x2.

Tabla 8. Datos radiológicos reportados en casos y controles.

Características	Casos n=82 (%)	Controles n=123 (%)	p
<i>Osteofitos</i>	78 (95.12)	0	0.001
<i>Huesos periarticulares</i>	1 (1.22)	0	0.219
<i>Estrechamiento articular</i>	70 (85.37)	78 (63.93)	0.001
<i>Pseudoquistes subcondrales</i>	4 (4.88)	1 (0.81)	0.064
<i>Calcificación tejidos blandos</i>	2 (2.44)	1 (0.81)	0.342
<i>Condrocalcinosis</i>	7 (8.54)	4 (3.25)	0.100
<i>Fracturas</i>	2 (2.44)	4 (3.25)	0.735
<i>Alineación radiológica</i>	3 (3.70)	5 (4.07)	0.896
<i>Alteraciones de patela</i>	20 (24.39)	24 (19.51)	0.405
<i>Prótesis de rodilla</i>	2 (2.44)	0	0.082
<i>Osteopenia</i>	10 (12.20)	22 (17.89)	0.271

Valor de p calculado con X^2 en tablas de contingencia de 2x2.

Tabla 9. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs225014 y rs12885300 en sujetos con OA y controles.

rs225014	Casos	Controles	OR (IC 95%)	p	OR^a (IC 95%)	p^a
Alelo	N=164 (%)	N=246 (%)				
C	96 (58.5)	146 (59.4)	0.97 (0.65-1.44)			
T	68 (41.5)	100 (40.6)	1.03 (0.67-1.57)	0.869		
Genotipo	N=82 (%)	N=123 (%)				
CC	27 (32.9)	46 (37.4)	0.82 (0.43-1.53)	0.513	1.15 (0.55-2.41)	0.693
TC	42 (51.2)	54 (43.9)	1.34 (0.73-2.44)	0.304	1.08 (0.38-2.18)	0.816
TT	13 (15.8)	23 (18.7)	0.81 (0.35-1.82)	0.599	0.69 (0.27-1.73)	0.432
rs12885300*	Casos	Controles	OR (IC 95%)	P	OR^a (IC 95%)	p^a
Alelo	N=164 (%)	N=244 (%)				
T	43 (26.22)	76 (31.15)	0.78 (0.49-1.24)			
C	121 (73.78)	168 (68.85)	1.27 (0.80-2.03)	0.283		
Genotipo	N=82 (%)	N=122 (%)				
TT	5 (6.10)	11 (9.02)	0.65 (0.17-2.15)	0.447	0.61 (0.14-2.67)	0.519
TC	33 (40.24)	54 (44.26)	0.85 (0.46-1.55)	0.569	0.62 (0.31-1.27)	0.199
CC	44 (53.66)	57 (46.72)	1.32 (0.72-2.40)	0.331	1.76 (0.87-3.56)	0.113

OR: Razón de momios en intervalo de confianza de 95%; p calculada con χ^2 en tablas de contingencia de 2x2. OR^a y p^a: Razón de momios y valor de p ajustados por edad, hipertensión arterial sistémica, alteraciones de la alineación y crepitación. rs12885300*: se excluyó del análisis un control por errores de genotipificación.

polimorfismo rs225014 (OR 1.86, IC95%: 1.01-3.42; p=0.031), la cual se mantuvo posterior al ajuste en la regresión logística; sin embargo, la asociación de los genotipos TC y CC de rs12885300 se evidenció en el análisis multivariado (OR 2.13, IC95%: 1.10-4.14, p=0.025 y OR 0.47, IC95%: 0.24-0.92, p=0.028, respectivamente) (tabla 10). El dolor a la presión ósea mostró asociación con el alelo C de rs12885300 (OR 1.72, IC95%: 1.07-2.82; p=0.019) y el genotipo TT (OR 0.21, IC95%: 0.02-0.96; p=0.027), aunque al ajustar las variables se modificó la asociación del genotipo TT (OR 0.26, IC95%:0.05-1.37; p=0.114) (tabla 11). También se asoció el genotipo TT de rs225014 con el dolor al reposo (OR 0.41, IC95%: 0.41-1.05; p=0.047), esta asociación se mantuvo al ajustar las variables en la regresión logística (tabla 12).

Además, se encontró asociación con variables radiológicas como las alteraciones patelares con el alelo T (OR 2.02, IC95%: 1.21-3.34; p=0.004) y los genotipos CC (OR 0.38, IC95%: 0.15-0.90, p=0.018) y TT del polimorfismo rs225014 (OR 2.51, IC95% 1.04-5.84; p=0.018) las cuales no se modificaron al ajustar las variables en la regresión logística. Sin embargo, el genotipo TT de rs12885300 mostró asociación solo al ajuste (OR 3.17, OR95%: 1.02-9.85, p=0.045) (tabla 13). No se observaron diferencias significativas en la asociación de ambos SNP con el resto de las características clínicas y radiológicas. Ambos polimorfismos mantuvieron el equilibrio de Hardy-Weinberg en los grupos control al analizar estas variables.

Tabla 10. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs225014 y rs12885300 en sujetos con alteraciones de la alineación de rodilla.

rs225014	AAR	Sin AAR	OR (IC 95%)	p	OR^a (IC 95%)	p^a
Alelo	N=160	N=250				
C	93 (58.13)	149 (59.60)	0.94 (0.61-1.43)			
T	67 (41.87)	101 (40.40)	1.06 (0.69-1.62)	0.767		
Genotipo	N=80	N=125				
CC	24 (30.00)	49 (39.20)	0.66 (0.34-1.25)	0.179	0.57 (0.28-1.14)	0.115
TC	45 (56.25)	51 (40.80)	1.86 (1.01-3.42)	0.031	2.08 (1.08-3.99)	0.027
TT	11 (13.75)	25 (20.00)	0.63 (0.26-1.45)	0.251	0.65 (0.27-1.55)	0.339
rs12885300*	AAR	Sin AAR	OR (IC 95%)	p	OR^a (IC 95%)	p^a
Alelo	N=160	N=248				
T	50 (31.25)	69 (27.82)	1.17 (0.74-1.86)			
C	110 (68.75)	179 (72.18)	0.84 (0.53-1.34)	0.457		
Genotipo	N=80	N=124				
TT	5 (6.25)	11 (8.87)	0.68 (0.17-2.24)	0.497	0.94 (0.27-3.27)	0.930
TC	40 (50.00)	47 (37.90)	1.63 (0.89-3.00)	0.088	2.13 (1.10-4.14)	0.025
CC	35 (43.75)	66 (53.23)	0.68 (0.37-1.24)	0.186	0.47 (0.24-0.92)	0.028

Valor de p calculado con χ^2 en tablas de contingencia de 2x2. AAR: alteraciones de la alineación de rodilla. OR^a y p^a: Razón de momios y valor de p ajustados por antecedente familiar de OA, inestabilidad, OA, dolor al movimiento, dolor al reposo y crepitación. rs12885300*: se excluyó del análisis un sujeto sin alteraciones de la alineación por errores de genotipificación.

Tabla 11. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs225014 y rs12885300 en sujetos con dolor a la presión ósea.

rs225014	DPO	Sin DPO	OR (IC 95%)	p	OR^a (IC 95%)	p^a
Alelo	N=158	N=252				
C	100 (63.29)	142 (56.35)	1.33 (0.87-2.05)			
T	58 (36.71)	110 (43.65)	0.74 (0.48-1.14)	0.164		
Genotipo	N=79	N=126				
CC	33 (41.77)	40 (31.75)	1.54 (0.82-2.87)	0.145	1.71 (0.86-3.37)	0.121
TC	34 (43.04)	62 (49.21)	0.77 (0.42-1.42)	0.389	0.67 (0.35-1.29)	0.235
TT	12 (15.19)	24 (19.05)	0.76 (0.32-1.71)	0.479	0.82 (0.34-1.99)	0.672
rs12885300*	DPO	Sin DPO	OR (IC 95%)	p	OR^a (IC 95%)	p^a
Alelo	N=156	N=252				
T	35 (22.44)	84 (33.33)	0.57 (0.35-0.93)			
C	121 (77.56)	168 (66.66)	1.72 (1.07-2.82)	0.019		
Genotipo	N=78	N=126				
TT	2 (2.56)	14 (11.11)	0.21 (0.02-0.96)	0.027	0.26 (0.05-1.37)	0.114
TC	31 (39.74)	56 (44.44)	0.82 (0.44-1.52)	0.509	0.71 (0.36-1.37)	0.315
CC	45 (57.69)	56 (44.44)	1.70 (0.92-3.14)	0.066	1.82 (0.94-3.51)	0.074

Valor de p calculado con X^2 en tablas de contingencia de 2x2. DPO: Dolor a la presión ósea. OR^a y p^a: Razón de momios y valor de p ajustados por limitación al movimiento y dolor al movimiento. rs12885300*: se excluyó del análisis un sujeto con dolor a la presión ósea por errores de genotipificación.

Tabla 12. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs225014 y rs12885300 en sujetos con dolor al reposo.

rs225014	DR	Sin DR	OR (IC 95%)	p	OR^a (IC 95%)	p^a
Alelo	N=138	N=272				
C	90 (65.22)	152 (55.88)	1.48 (0.94-2.31)			
T	48 (34.78)	120 (44.12)	0.67 (0.43-1.05)	0.069		
Genotipo	N=69	N=136				
CC	28 (40.58)	45 (33.09)	1.38 (0.72-2.61)	0.289	1.83 (0.91-3.70)	0.089
TC	34 (49.28)	62 (45.59)	1.15 (0.62-2.15)	0.617	0.94 (0.48-1.85)	0.875
TT	7 (10.14)	29 (21.32)	0.41 (0.14-1.05)	0.047	0.37 (0.14-1.00)	0.052
rs12885300*	DR	Sin DR	OR (IC 95%)	p	OR^a (IC 95%)	p^a
Alelo	N=136	N=272				
T	35 (25.74)	84 (30.88)	0.77 (0.47-1.25)			
C	101 (74.26)	188 (69.12)	1.28 (0.79-2.11)	0.281		
Genotipo	N=68	N=136				
TT	2 (2.94)	14 (10.29)	0.26 (0.02-1.21)	0.066	0.27 (0.05-1.49)	0.135
TC	31 (45.59)	56 (41.18)	1.19 (0.63-2.24)	0.548	0.99 (0.51-1.93)	0.995
CC	35 (51.47)	66 (48.53)	1.12 (0.60-2.10)	0.692	1.29 (0.66-2.51)	0.449

Valor de p calculado con X^2 en tablas de contingencia de 2x2. DR: Dolor al reposo. OR^a y p^a: Razón de momios y valor de p ajustados por escolaridad, rigidez articular matutina, alteraciones de la alineación y dolor al movimiento. rs12885300*: se excluyó del análisis un sujeto con dolor al reposo por errores de genotipificación.

Tabla 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs225014 y rs12885300 en sujetos con alteraciones patelares.

rs225014	AP	Sin AP	OR (IC 95%)	p	OR^a (IC 95%)	p^a
Alelo	N=88	N=322				
C	40 (45.45)	202 (62.73)	0.49 (0.29-0.81)			
T	48 (54.55)	120 (37.27)	2.02 (1.21-3.34)	0.004		
Genotipo	N=44	N=161				
CC	9 (20.45)	64 (39.75)	0.38 (0.15-0.90)	0.018	0.38 (0.17-0.85)	0.019
TC	22 (50.00)	74 (45.96)	1.17 (0.57-2.42)	0.634	1.10 (0.55-2.16)	0.782
TT	13 (29.55)	23 (14.29)	2.51 (1.04-5.84)	0.018	3.07 (1.35-7.00)	0.007
rs12885300*	AP	Sin AP	OR (IC 95%)	p	OR^a (IC 95%)	p^a
Alelo	N=88	N=320				
T	30 (34.09)	89 (27.81)	1.34 (0.77-2.27)			
C	58 (65.91)	231 (72.19)	0.74 (0.43-1.28)	0.251		
Genotipo	N=44	N=160				
TT	6 (13.63)	10 (6.25)	2.36 (0.66-7.69)	0.107	3.17 (1.02-9.85)	0.045
TC	18 (40.91)	69 (43.12)	0.91 (0.43-1.89)	0.792	0.92 (0.46-1.82)	0.817
CC	20 (45.46)	81 (50.63)	0.81 (0.39-1.67)	0.544	0.75 (0.37-1.48)	0.410

Valor de p calculado con X^2 en tablas de contingencia de 2x2. AP: Alteraciones patelares. OR^a y p^a: Razón de momios y valor de p ajustados por escolaridad. rs12885300*: se excluyó del análisis un sujeto sin alteraciones patelares por errores del genotipificación.

DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la asociación de los polimorfismos rs225014 y 12885300 del gen *DIO2*, un gen involucrado en el desarrollo del cartílago articular al regular los niveles intracelulares de hormona tiroidea en el condrocito, con OA primaria de rodilla en pacientes mestizos mexicanos. Previamente, estos polimorfismos se encontraron asociados con OA en sujetos ingleses, japoneses y holandeses, pero esa asociación no se había analizado en esta población. Al ser la población mexicana una población mestiza su estratificación genética permite corroborar la implicación de un alelo pertinente en los estudios de asociación.

En este estudio se pudieron observar diferencias entre las frecuencias alélicas de los SNP estudiados con respecto a las reportadas en otros estudios. El alelo C en el polimorfismo rs225014 presentó una frecuencia del 59.4% a diferencia de lo reportado en la base de datos dbSNP de la NCBI y en otros estudios realizados en la población China, en indios Pima y en las poblaciones estudiadas por Meulenbelt y colaboradores (2008) donde este alelo se reporta como alelo menor con una frecuencia del 18-45.8% (Guo et al., 2004; Meulenbelt et al., 2008; Xiong et al., 2010; Nair et al., 2012). En cuanto a rs12885300, en este estudio se encontró al alelo T como alelo menor con una frecuencia de 31.15%, similar a la frecuencia reportada por Meulenbelt y colaboradores (2008), 34%, pero diferente de lo reportado en la dbSNP donde presenta una frecuencia de 19.19%. Estas diferencias pueden ser explicadas por la estratificación genética propia de la población mestiza mexicana la cual tiene genes de población amerindia, europea y en menor proporción africana (Silva-Zolezzi et al., 2009). Además el tamaño de

muestra de este estudio es relativamente pequeño en comparación con los estudios mencionados por lo que al aumentar el tamaño de la muestra podrían cambiar las frecuencias reportadas.

Durante el análisis univariado se encontraron diferencias significativas en ambos grupos en la edad, hipertensión arterial sistémica y antecedente familiar de Diabetes mellitus tipo 2 lo que podría ser una limitante. Sin embargo, en el análisis multiivariado se analizó su efecto sin encontrar modificaciones en las ORs para su asociación con OA, por lo tanto consideramos que nuestros resultados no están influenciados por posibles confusores.

En este estudio no se observó una asociación significativa entre los polimorfismos rs225014 y rs12885400 con la OA de rodilla a diferencia de lo reportado por Meulenbelt en las poblaciones antes mencionadas (Meulenbelt et al., 2008). Hämäläinen y colaboradores (2014) estudiaron la asociación de polimorfismos en distintos genes, en los que se incluyó a rs225014, con OA de manos en mujeres dentistas y profesoras finlandesas; ellos tampoco encontraron asociación entre este SNP con OA (Hämäläinen et al., 2014). Sin embargo, estudios de epigenética relacionaron cambios en la metilación de dinucleótidos CpG río arriba en la secuencia de *DIO2* que provocaron un aumento en su expresión génica asociándose aún más con la presencia del polimorfismo rs225014, lo que resultó en una reducción en la capacidad de los condrocitos para producir MEC (Bomer et al., 2015). A diferencia de este estudio donde no se encontró relación con OA y rs12885300, este polimorfismo se ha relacionado con la forma de la cadera y su susceptibilidad para desarrollar OA en hermanos afectados con la enfermedad

(Waarsing et al., 2011). Las diferencias entre los hallazgos de este estudio y los estudios que corroboran la asociación de *DIO2* con OA pueden estar relacionadas con el tamaño de la muestra. También debemos considerar las interacciones gen-gen con las variantes genéticas propias de la población mexicana en genes que participan en las vías de acción de *DIO2* que podrían actuar como genes modificadores de la actividad de *DIO2* y su función sobre el cartílago articular. Además debemos tomar en cuenta que las características culturales propias de esta población podrían modificar el riesgo de presentar OA de rodilla debido a interacciones gen-medioambiente. En el análisis multivariado tampoco se demostró la capacidad de estos polimorfismos para aumentar el riesgo de presentar la enfermedad.

Aun cuando no se trataba del objetivo general de este estudio, se decidió explorar la asociación de ambos polimorfismos con variables clínicas, que no se habían analizado hasta este momento en ninguna población para este gen. En este estudio se encontró que el genotipo TC de rs225014 es un factor de riesgo para el desarrollo de alteraciones de la alineación de la rodilla (OR 1.86, IC95%: 1.01-3.42) que no se modificó al realizar un ajuste con regresión logística. Además en el análisis multivariado se encontró asociación con el polimorfismo rs12885300 donde el genotipo TC se comportó como factor de riesgo (OR 2.13, IC95%: 1.10-4.14) y el genotipo CC como factor protector (OR 0.47 IC95%: 0.24-0.92). Estas modificaciones encontradas al ajustar el modelo de asociación pueden significar que existe cierta influencia genética en el desarrollo de estas alteraciones aunque su asociación se ve afectada por otras variables.

También se reportó la asociación del alelo C y el genotipo TT de rs12885300 como factores de riesgo y protector (OR 1.72, IC95%: 1.07-2.82; y OR 0.21, IC95%: 0.02-0.96, respectivamente) del dolor a la presión ósea (aunque en el análisis multivariado no se mantuvo la asociación del genotipo TT), así como el genotipo TT de rs225014 como factor protector para el dolor al reposo. Otros genes ya se han reportado antes asociados con el dolor de rodilla en OA. Valdes y colaboradores (2011) reportaron la asociación como factor protector del genotipo Ile-Ile del polimorfismo rs8065080 de *TRPV1*, un gen que codifica para el canal de cationes con potencial de receptor transitorio, de la subfamilia V, miembro 1, cuya expresión aumenta en el cartílago articular por acción de citosinas inflamatorias (Valdes et al., 2011). Otro reporte de genes involucrados con el dolor articular es el de Day-Williams y colaboradores que reportaron un estudio de GWAS donde se encontró una asociación del polimorfismo rs11842874 del gen *MCF2L* (Secuencia Parecida a la Transformante de Línea Celular-2) con la OA de rodilla. El gen *MCF2L* regula la actividad del Factor de crecimiento nervioso *NGF* cuya inhibición disminuye el dolor articular (Day-Williams et al., 2011). También se han asociado con dolor de rodilla polimorfismos en el gen *VDR* (Receptor de vitamina D) (Muraki et al., 2011).

Los genes involucrados se relacionan con el voltaje iónico y el metabolismo articular. En la literatura se encuentran reportes en los cuales estos genes participan en vías en las que también participa *DIO2*, aunque no existe evidencia de que haya interacción entre ellos. Por ejemplo, se sabe que el gen *DIO2* participa en las vías energéticas del tejido adiposo marrón (Gereben et al., 2008)

así como *TRPV1* (Birerdinc et al., 2013), aunque no se conoce la influencia, si es que existe, que ejerce uno sobre el otro. Así mismo, en dos estudios llevados a cabo en un modelo de rata con hipotiroidismo secundario se encontró una relación entre los niveles de hormona tiroidea y la expresión de *NGF* en el hipocampo y la disminución de la activación de vías reguladas por *NGF* necesarias para la actividad celular como ERK, CREB y AKT (Sinha et al., 2009; Zhang et al., 2009); *DIO2* también se expresa en el hipocampo (Gereben et al., 2008). También se conoce la relación de *NGF* y la hormona tiroidea con el desarrollo óseo, así lo reportan Yao y colaboradores quienes demostraron que en las costillas de las ratas con hipertiroidismo se aumenta la expresión de *NGF* en comparación con ratas eutiroideas (Yao et al., 2002).

En este estudio también se analizó la asociación de los polimorfismos estudiados con los datos radiológicos reportados. Se encontraron diferencias significativas con respecto a alteraciones de la patela relacionadas con el alelo T (OR 2.02, IC95%: 1.21-3.34) y el genotipo TT del polimorfismo rs225014 (OR 2.51, IC95%: 1.04-5.84), ambos como factores de riesgo. También el genotipo TT de rs12885300 fue encontrado como factor de riesgo (OR 3.17, IC95%: 1.02-9.85), aunque solo en el análisis multivariado, esto se debe a que posiblemente interactúa con otros genes u otras variables ambientales que modifican su actividad. Hasta el momento no se ha reportado una asociación similar.

Si bien no se encontraron diferencias significativas en la asociación de los polimorfismos estudiados con OA de rodilla los resultados reportados nos sugieren nuevas pautas de investigación para futuros proyectos. Aun cuando las diferencias

que se reportaron con respecto a las variables clínicas y radiológicas sean significativas es importante tomar con cautela los resultados y someterse a estudios de replicación para corroborar los hallazgos. También es conveniente realizar estudios de interacción gen-gen y gen-medio ambiente para saber cuándo es plausible tal interacción y su influencia en el desarrollo de la OA y de los demás rasgos estudiados.

CONCLUSIONES

La edad, ocupación, hipertensión arterial sistémica, inestabilidad, alteraciones de la alineación, crecimiento óseo, crepitación, derrame articular, limitación al movimiento, osteofitos y estrechamiento articular fueron las principales variables clínicas y radiológicas asociadas con OA en este estudio.

No se encontró asociación significativa entre los SNP rs225014 y rs12885300 con OA de rodilla en esta muestra.

Se encontraron asociaciones entre ambos polimorfismos y variables clínicas y radiológicas como alteraciones de la alineación, el dolor articular y las alteraciones patelares.

Es necesario aumentar el tamaño de la muestra además de enfocar el análisis en las variables dolor articular al reposo y la presión, alteraciones de alineación en rodilla y alteraciones patelares en estudios de replicación posteriores.

BIBLIOGRAFÍA:

Adams S. L., Cohen A. J., Lassoova L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J Cell Physiol.* 2007; 213:635-41.

Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Boreenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 1986; 29:1039-49.

Amin S, Goggins J, Niu J, Guermazi A, Grigoryan M, Hunter DJ, et al. Occupation-related squatting, kneeling, and heavy lifting and the knee joint: a magnetic resonance imaging-based study in men. *J Rheumatol.* 2008; 35:1645–9.

arcOGEN Consortium. arcOGEN Collaborators Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet.* 2012; 380:815–23.

Bartha T, Kim SW, Salvatore D, Gereben B, Tu HM, Harney JW, et al. Characterization of the 5-prime-flanking and 5-prime-untranslated regions of the cyclic adenosine 3-prime,5-prime-monophosphate-responsive human type 2 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology.* 2000; 141:229-37.

Birerdinc A, Jarrar M, Stotish T, Randhawa M, Baranova A. Manipulating molecular switches in brown adipocytes and their precursors: a therapeutic potential. *Prog Lipid Res.* 2013; 52:51-61.

Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18:24–33.

Bomer N, den Hollander W, Ramos Y, Bos SD, van der Breggen R, Lakenberg N, et al. Underlying molecular mechanisms of DIO2 susceptibility in symptomatic osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015; 74: 1571-9.

Borges-Yáñez SA, Gómez-Dantés H. Uso de los servicios de salud por la población de 60 años y más en México. *Salud Publica Mex*. 1998; 40:13-23.

Borgonio-Cuadra VM, González-Huerta C, Duarte-Salazar C, de Los Ángeles Soria-Bastida M, Cortés-González S, Miranda-Duarte A. Analysis of estrogen receptor alpha gene haplotype in Mexican mestizo patients with primary osteoarthritis of the knee. *Rheumatol Int*. 2012; 32:1425-30.

Bos SD, Bovée JV, Duijnisveld BJ, Raine EV, van Dalen WJ, Ramos YF, et al. Increased type II deiodinase protein in OA-affected cartilage and allelic imbalance of OA risk polymorphism rs225014 at DIO2 in human OA joint tissues. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71:1254-8.

Castañeda S., Roman-Blas J. A., Largo R., Herrero-Beaumont G. Subchondral bone as a key target for Osteoarthritis treatment. *Biochemical Pharmacology*. 2012; 83:315–23.

Celi F, Canettieri G, Yarnall DP, Burns DK, Andreoli M, Shuldiner AR, et al. Genomic characterization of the coding region of the human type II 5-prime-deiodinase gene. *Molec Cell Endocr.* 1998; 141:49-52.

Chapchal G. Posttraumatic osteoarthritis after injury of the knee and hip joint. *Reconstr Surg Traumatol.* 1978; 16:87-94.

Cheng A., Bolognesi M., Kraus V. B. DIO2 modifies inflammatory responses in chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage.* 2012; 20:440-5.

Christensen R, Bartels EM, Astrup A, Bliddal H. Effect of weight reduction in obese patients diagnosed with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66:433–9.

Claessen KM, Ramautar SR, Pereira AM, Smit JW, Biermasz NR, Kloppenburg M. Relationship between insulin-like growth factor-1 and radiographic disease in patients with primary osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012; 20:79-86.

Cooper C, Inskip H, Croft P, Campbell L, Smith G, McLaren M, Coggon D. Individual risk factors for hip osteoarthritis: Obesity, hip injury, and physical activity. *Am J Epidemiol* 1998; 147:516-522.

Day-Williams AG, Southam L, Panoutsopoulou K, Rayner NW, Esko T, Estrada K, et al. A variant in MCF2L is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet.* 2011; 89:446–50.

De Pavío-Mota E, Larios-González MG, Briceño-Cortés G. Manejo de la osteoartrosis en medicina familiar y ostopedia. Archivos en Medicina familiar. 2005; 7:93-98.

Dentice M, Bandyopadhyay A, Gereben B, Callebaut I, Christoffolete MA, Kim BW, et al. The hedgehog-inducible ubiquitin ligase subunit WSB-1 modulates thyroid hormone activation and PTHrP secretion in the developing growth plate. Nat Cell Biol. 2005; 7:698–705.

Doré DA, Winzenberg TM, Ding C, Otahal P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, et al. The association between objectively measured physical activity and knee structural change using MRI. Ann Rheum Dis. 2013; 72:1170-5.

Edd SN, Giori NJ, Andriacchi TP. The role of inflammation in the initiation of osteoarthritis after meniscal damage. J Biomech. 2015; 48:1420-6.

Evangelou E, Valdes AM, Kerkhof HJ, Stykarsdottir U, Zhu Y, Meulenbelt I, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. Ann Rheum Dis. 2011; 70:349–355.

Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of kneeosteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. Arthritis Rheum. 1987; 30:914–8.

Fytily P, Giannatou E, Papanikolaou V, Stripeli F, Karachalios T, Malizos K, et al. Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors alpha, beta, and androgen receptor genes with knee osteoarthritis. Clin Genet. 2005; 68:268-77.

Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, et al. Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Reviews* 2008; 29:898-938.

Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann NY Acad Sci.* 2010; 1192:230-7.

Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2011; 23:471-8.

Golightly YM, Allen KD, Helmick CG, Schwartz TA, Renner JB, Jordan JM. Hazard of Incident and Progressive Knee and Hip Radiographic Osteoarthritis and Chronic Joint Symptoms in Individuals with and without Limb Length Inequality. *J Rheumatol.* 2010; 37:2133–40.

Guo TW, Zhang FC, Yang MS, Gao XC, Bian L, Duan SW, et al. Positive association of the DIO2 (deiodinase type 2) gene with mental retardation in the iodine-deficient areas of China. *J Med Genet.* 2004; 41:585-90.

Hämäläinen S, Solovieva S, Vehmas T, Luoma K, Leino-Arjas P, Hirvonen A. Genetic influences on hand osteoarthritis in Finnish women – a replication study of candidate genes. *PLoS ONE.* 2014; 9:e97417.

Hanna FS, Wluka AE, Bell RJ, Davis SR, Cicuttini FM. Osteoarthritis and the postmenopausal woman: Epidemiological, magnetic resonance imaging, and radiological findings. *Semin Arthritis Rheum.* 2004; 34:631-6.

Harvey WF, Yang M, Cooke TD, Segal NA, Lane N, Lewis CE, et al. Association of leg-length inequality with knee osteoarthritis: a cohort study. *Ann Intern Med.* 2010; 152:287–95.

Hashimoto M, Nakasa T, Hikata T, Asahara H. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Medicinal Research Reviews.* 2008; 28:464-81.

Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castañeda S, Jiménez SA. Primary Osteoarthritis no longer primary: Three subsets with distinct etiological, clinical and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum.* 2009; 39:71-80.

Horton Jr WE, Bennion P, Yang L. Cellular, molecular and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006; 6:379-81.

Hunter DJ. Osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* 2011; 25:801–14.

Ikeda T, Mabuchi A, Fukuda A, Kawakami A, Ryo Y, Yamamoto S, et al. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in cartilage-specific collagen genes with knee and hip osteoarthritis in the Japanese population. *J Bone Miner Res.* 2002; 17:1290-6.

Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, Luta G, Dragomir AD, Woodard J, et al. Prevalence of hip symptoms and radiographic and symptomatic hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol.* 2009; 36:809–15.

Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, Luta G, Dragomir AD, Woodard J, et al. Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol*. 2007; 34:172–80.

Kellgren JH, Lawrence JS, Bier F. Genetic factors in generalized osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1963; 22:237-55.

Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assesment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis*. 1957; 16:494-502.

Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003; 423:332–6.

Lane NE, Oehlert JW, Bloch DA, Fries JF. The relationship of running to osteoarthritis of the knee and hip and bone mineral density of the lumbar spine: a 9 year longitudinal study. *J Rheumatol*. 1998; 25:334–41.

Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum*. 2008; 58:26–35.

Leiria LB, Dora JM, Wajner SM, Estivalet AAF, Crispim D, Maia AL. The rs225017 polymorphism in the 3'UTR of the human DIO2 gene is associated with increased insulin resistance. *PLoS ONE*. 2014; 9:e103960.

Loughlin J, Sinsheimer JS, Mustafa Z, Carr AJ, Clipsham K, Bloomfield VA, et al. Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene

COL1A1, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2000; 27:779-84.

Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem.* 2009; 284:723-7.

McWilliams DF, Leeb BF, Muthuri SG, Doherty M, Zhang W. Occupational risk factors for osteoarthritis of the knee: a meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011; 19:829–39.

Meulenbelt I, Min JL, Bos S, Riyazi N, Houwing-Duistermaat JJ, van der Wijk HJ, et al. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Human Molecular Genetics.* 2008; 17:1867-75.

Muraki S, Dennison E, Jameson K, Boucher BJ, Akune T, Yoshimura N, et al. Association of vitamin D status with knee pain and radiographic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011; 19:1301-6.

Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, Renner JB, Tudor G, Koch G, et al. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 59:1207–13.

Nagase H, Nagasawa Y, Tachida Y, Sakakibara S, Okutsu J, Suematsu N, et al. Deiodinase 2 upregulation demonstrated in osteoarthritis patients cartilage causes cartilage destruction in tissue-specific transgenic rats. *Osteoarthritis and cartilage.* 2013; 21:514-523.

Nair S, Muller YL, Ortega E, Kobes S, Bogardus C, Baier LJ. Association analyses of variants in the DIO2 gene with early-onset type 2 diabetes mellitus in Pima indians. *Thyroid.* 2012; 22:80-7.

Neogi T., Zhang Y. Epidemiology of OA. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013; 39:1-19.

Nguyen US, Zhang Y, Zhu Y, Niu J, Zhang B, Felson DT. Increasing prevalence of knee pain and symptomatic knee osteoarthritis: survey and cohort data. *Ann Intern Med.* 2011; 155:725–32.

Ohba K., Yoshioka T., Muraki T. Identification of two novel splicing variants of human type II iodothyronine deiodinase mRNA. *Molec Cell Endocr.* 2001; 172:169-75.

Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum.* 1995; 38:1134–41.

Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *OsteoArthritis and Cartilage.* 2006; 14:13-29.

Raine EV, Wreglesworth N, Dodd AW, Reynard LN, Loughlin J. Gene expression analysis reveals HBP1 as a key target for the osteoarthritis susceptibility locus that maps to chromosome 7q22. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71:2020-27.

Richette P., Corvol M., Bardin T. Estrogens, Cartilage, and Osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2003; 70:257-62.

Robson H, Siebler T, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology.* 2000; 141:3887–97

Rodríguez-Amado J, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Goycochea-Robles MV, Sanin LH, Burgos-Vargas R, et al. The social gap index and the prevalence of Osteoarthritis in the community: a cross-sectional multilevel study in Mexico. *Clin Reumatol*. 2014; doi: 10.1007/s10067-014-2776-y.

Schlesselman JJ. *Case-control studies. Design, conduct, analysis*. New York: Oxford University Press; 1982.

Scott D, Kowalczyk A. Osteoarthritis of the knee. *BMJ Clinical Evidence*. 2007; 9:1121.

Sharma L, Song J, Dunlop D, Felson D, Lewis CE, Segal N, et al. Varus and valgus alignment and incident and progressive knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69:1940–5.

Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo population to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:8611-6.

Simon D, Mascarenhas R, Saltzman BM, Rollins M, Bach BR Jr, MacDonald P. The Relationship between Anterior Cruciate Ligament Injury and Osteoarthritis of the Knee. *Adv Orthop*. 2015; 2015:928301.

Sinha RA, Pathak A, Kumar A, Tiwari M, Shrivastava A, Godbole MM. Enhanced neuronal loss under perinatal hypothyroidism involves impaired neurotrophic

signaling and increased proteolysis of p75(NTR). *Mol Cell Neurosci.* 2009; 40:354-64.

Song GG, Kim JH, Lee YH. A meta-analysis of the relationship between aspartic acid (D)-repeat polymorphisms in asporin and osteoarthritis susceptibility. *Rheumatol Int.* 2014; 34:785-92.

Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *British Medical Journal.* 1996; 312:940-3.

Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005; 13:769–81.

Stecher RM. Heberden's nodes: heredity in hypertrophic arthritis of the finger joints. *Am J Med Sci.* 1941; 210:801-9.

Valdes AM, De Wilde G, Doherty SA, Lories RJ, Vaughn FL, Laslett LL, et al. The Ile585Val TRPV1 variant is involved in risk of painful knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70:1556-61.

Valdes AM, Evangelou E, Kerkhof HJ, Tamm A, Doherty SA, Kisand K, et al. The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70:873–5.

Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, et al. Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP,

and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:137-46.

Waarsing JH, Kloppenburg M, Slagboom PE, Kroon HM, Houwing-Duistermaat JJ, Weinans H, et al. Osteoarthritis susceptibility genes influence the association between hip morphology and osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 2011; 63:1349-54.

Wang L, Shao YY, Ballock RT. Thyroid hormone-mediated growth and differentiation of the growth plate chondrocytes involves IGF-1 modulation of beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res.* 2010; 25:1138-46.

Wang Y, Simpson JA, Wluka AE, Teichtahl AJ, English DR, Giles GG, et al. Is physical activity a risk factor for primary knee or hip replacement due to osteoarthritis? A prospective cohort study. *J Rheumatol.* 2011; 38:350–7.

Xiong YM, Mo XY, Zou XZ, Song RX, Sun WY, Lu W, et al. Association study between polymorphisms in selenoprotein genes and susceptibility to Kashin-Beck disease. *Osteoarthritis and cartilage* 2010; 18:817-24.

Yao M, Dooley PC, Schuijers JA, Grills BL. Nerve growth factor and norepinephrine concentrations in weight-bearing and non-weight-bearing bones of euthyroid and hyperthyroid rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002; 2:327-34.

Yusuf E. Metabolic factors in osteoarthritis: obese people do not walk on their hands. *Arthritis Research & Therapy.* 2012; 14:123.

Zhai G, Rivadeneira F, Houwing-Duistermaat JJ, Meulenbelt I, Bijkerk C, Hofman A, et al. Insulin-like growth factor I gene promoter polymorphism, collagen type II alpha1 (COL2A1) gene, and the prevalence of radiographic osteoarthritis: the Rotterdam Study. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63:544-8.

Zhang L, Blomgren K, Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM. Effects of postnatal thyroid hormone deficiency on neurogenesis in the juvenile and adult rat. *Neurobiol Dis.* 2009; 34:366-74.

Zhang R, Yao J, Xu P, Ji B, Luck JV, Chin B, et al. A comprehensive meta-analysis of association between genetic variants of *GDF5* and osteoarthritis of the knee, hip and hand. *Inflamm Res.* 2015; 64:405-14.

Zhang Y, Xu L, Nevitt MC, Aliabadi P, Yu W, Qin M, et al. Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 2001; 44:2065–71.

ANEXOS

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO

México, D.F. a de de 20 .

A Quien Corresponda:

Por medio de la presente, informo que he dado mi consentimiento en forma libre, voluntaria y sin presiones para participar en el trabajo de investigación: “Asociación de Polimorfismos Génicos del gen *DIO2* y microRNAs, y perfil de metilación de microRNAs, en Osteoartritis de Rodillas”, cuyo responsable es el Dr. Antonio Miranda Duarte y que se realiza en el Servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Previamente, se me ha explicado que existen algunos factores o componentes hereditarios que se transmiten de generación en generación (de padres a hijos) y que podrían aumentar la posibilidad de que aparezca una enfermedad. Estos componentes hereditarios son variaciones que pueden presentarse en nuestro material genético o hereditario, que no causan daño, pero que algunas de estas variaciones se han relacionado con la presencia de algunas enfermedades, como la osteoartritis.

También me explicaron que lo que se quiere saber con esta investigación es conocer si la gente que tiene algunas variaciones en estos factores genéticos tiene más posibilidades de presentar osteoartritis de las rodillas en comparación con la gente que no tiene esas variaciones. Para esto, es necesario reunir un grupo de pacientes con osteoartritis de rodillas y otro grupo de pacientes sin osteoartritis de rodillas. Luego, se va a tomar una muestra de sangre con una jeringa en la vena del brazo; ya que de la sangre se puede obtener una muestra del material hereditario y allí se puede saber si variación del componente genético está presente o no. Esa toma de muestra es igual a la que se realiza en los laboratorios clínicos y es un procedimiento sencillo que no tiene peligros, si acaso, podría formarse un moretón.

Se me comentó también que todo este procedimiento no tiene ningún costo para mí, y que no es necesario para hacer un diagnóstico o darme un tratamiento para mi padecimiento, pero entiendo que con los resultados de ésta investigación se conocerá mejor a la enfermedad y los factores que la desencadenan. También se me explicó que es

posible que guarden una parte del material hereditario que se obtenga de la sangre, porque es posible que después estudien otros factores que en este momento no pueden ser analizados.

Asimismo, se me ha explicado que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación, que estoy en libertad de negarme a participar en el presente estudio ya que es una participación voluntaria y, que en caso de negarme a participar, la atención que recibo en esta Institución no cambiará.

_____	_____
Nombre	Firma
_____	_____
Nombre del investigador	Firma

ANEXO 2

Instituto Nacional de Rehabilitación

Servicio de Genética

“Asociación de Polimorfismos Génicos del gen *DIO2* y microRNAs, y perfil de metilación de microRNAs, en Osteoartritis de Rodillas”

Ca: __ Co: __ No: __:__:__:__:

No expediente: __:__:__:__:__:

Fecha: __:__:__:__:__:

día mes año

Nombre: _____

Tel. _____ Dom. _____

Sexo: __:__: Masc __:__: Fem

Edad: __:__:

Fecha de nacimiento: __:__:__:__:__:__:

día mes año

Lugar de Origen: _____

Estado civil: Soltero __:__: Casado __:__: Divorciado __:__: Viudo __:__: U.L. __:__:

Clasificación socioeconómica: __:__: (nivel asignado por Trabajo Social del CNR)

Tabaquismo si __:__: no __:__: Desde cuándo: _____

No. Cigarros al día: _____

Alcoholismo si __:__: no __:__: Desde cuándo: _____

Intensidad: _____

Menopausia si __:__: no __:__: (ausencia de menstruación por 12 meses consecutivos)

Especificar tiempo: _____

Escolaridad

Sin estudios __:__:

Primaria completa __:__:

Primaria incompleta __:__:

Secundaria completa __:__:

Secundaria incompleta __:__:

Preparatoria completa __:__:

Preparatoria incompleta __:__:

Est. Superiores compl. __:__:

Est. Superiores incomp. __:__:

Especificar estudios superiores: _____

Otros estudios compl. __:__:

Otros estudios incomp. __:__:

Especificar otros estudios: _____

Ocupación

Ocupación actual: _____

Desde cuando: __:__:__:__:__ (año)

Ocupación anterior: _____

Desde cuando: :__:__:__: (año) Hasta cuando: :__:__:__: (año)

Ocupación anterior: _____

Desde cuando: :__:__:__: (año) Hasta cuando: :__:__:__: (año)

Traumatismos

Traumatismos frecuentes en rodilla si :__: no :__:

Accidentes previos con daño en rodilla si :__: no :__:

Especificar: _____

Tratamiento empleado para los casos anteriores si :__: no :__:

Especificar: _____

Actividad deportiva

Deporte actual si :__: no :__:

Especificar: _____

Inicio :__:__:__: Regular :__: Irregular :__: Veces a la semana 1:__: 2:__: 3:__: 4:__: 5:__: 6:__: 7:__:
(año)

Deporte anterior si :__: no :__:

Especificar: _____

Inicio :__:__:__: (año) Suspensión :__:__:__: (año)

Regular :__: Irregular :__: Veces a la semana 1:__: 2:__: 3:__: 4:__: 5:__: 6:__: 7:__:

Antecedentes heredo-familiares

	1 ^{er} grado (Padres, Hermanos, Hijos)	2 ^o grado (Abuelos, Tíos, Nietos, Sobrinos)	3 ^{er} grado (Primos hermanos)
Dx. de Osteoartritis	:__:	:__:	:__:
Especificar familiar	:_____:	:_____:	:_____:
Esp. sitio anatómico	:_____:	:_____:	:_____:
Especificar familiar	:_____:	:_____:	:_____:
Esp. sitio anatómico	:_____:	:_____:	:_____:
Especificar familiar	:_____:	:_____:	:_____:
Esp. sitio anatómico	:_____:	:_____:	:_____:
Hipertensión arterial	:__:	:__:	:__:
Cardiopatía	:__:	:__:	:__:
Diabetes mellitus 2	:__:	:__:	:__:
Cáncer	:__:	:__:	:__:
Especificar cáncer	_____		
Otro antecedente	:__:	:__:	:__:
Especificar	_____		
Otro antecedente	:__:	:__:	:__:
Especificar	_____		

Otro antecedente :__ :__ :__

Especificar _____

Enfermedades concomitantes

Tratamiento y duración

Diabetes mellitus 2 si :__ no :__ :_____:

Hipertensión arterial si :__ no :__ :_____:

Cardiopatía si :__ no :__ :_____:

Cáncer:_____ si :__ no :__ :_____:

Hipercolesterolemia: si :__ no :__ :_____:

Otra:_____ si :__ no :__ :_____:

Otra:_____ si :__ no :__ :_____:

Información importante, no omitir Talla :__ :__ :__ cm Peso :__ :__ (Kg.) :__ :__ :__ (gr.) IMC (kg/m ²) :_____:
--

Evaluación clínica en osteoartritis

Fecha de inicio de la osteoartritis :__ :__ :__

(Primera manifestación atribuible a la enfermedad) día mes año

Fecha de diagnóstico :__ :__ :__

día mes año

Síntomas

Edad :_____ si :__ no :__

Dolor de RD y/o RI al movimiento si :__ no :__

Dolor de RD y/o RI al movimiento y reposo si :__ no :__

Sensación de “inestabilidad” si :__ no :__

RAM en minutos _____ si :__ no :__

Signos

Alteraciones en alineación si :__ no :__

 Geno valgo si :__ no :__

 Geno varo si :__ no :__

Crecimiento óseo si :__ no :__

Laxitud ligamentaria si :__ no :__

Dolor a la presión ósea si :__ no :__

Crepitación si :__ no :__

Derrame articular si :__ no :__

Limitación del movimiento si :__ no :__

Calor no palpable si :__ no :__

Otros datos: _____

Observaciones: _____

Elaboró:

ANEXO 3

Instituto Nacional de Rehabilitación

Servicio de Genética

“Asociación de Polimorfismos Génicos del gen *DIO2* y microRNAs, y perfil de metilación de microRNAs, en Osteoartritis de Rodillas”

Nombre del paciente: _____

Datos radiológicos de osteoartritis:

Sin datos radiológicos: __:

Osteofitos:

- :__: Osteofitos posibles en los bordes
- :__: Osteofitos definitivos
- :__: Osteofitos múltiples moderados
- :__: Grandes osteofitos

Espacio articular:

- :__: Disminución dudosa del espacio articular
- :__: Disminución posible del espacio articular
- :__: Disminución definitiva del espacio articular
- :__: Disminución acentuada del espacio articular

Esclerosis:

- :__: Cierta esclerosis
- :__: Esclerosis intensa

Deformación ósea terminal:

- :__: Deformación ósea terminal posible
- :__: Deformación ósea terminal definitiva

Grado radiológico por clasificación Kellgren-Lawrence: 0:__: 1:__: 2:__: 3:__: 4:__:

Observaciones: _____

Evaluador: _____ Fecha: _____

ANEXO 4

Extracción de DNA a partir de 500 microlitros de glóbulos blancos (PureGene Blood Core Kit B Quiagen).

- 1.- Centrifugar sangre total a 2500 rpm, 8 min.
- 2.- Extraer con pipeta y trasvasar 500 microlitros de la capa leucocitaria.
- 3.- Agregar 1300 microlitros de solución de lisis RBC, mezclar por inversión 10 veces.
- 4.- Incubar 4 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 3000 rpm por 8 minutos.
- 5.- Desechar sobrenadante y repetir desde paso tres hasta obtener un sobrenadante rojo tenue y un botón blanco.
- 6.- Agitar en vortex fuertemente hasta homogenizar el botón con un sobrenadante de aproximadamente 10 microlitros.
- 7.- Agregar 500 microlitros de solución de lisis celular y agitar en vortex por 25 segundos. En caso de no homogenizarse disgregar el boton a 37°C o con pipeteo brusco.
- 8.- Agregar 170 microlitros de solución de precipitación de proteínas. Agitar vigorosamente en vortex por 20 segundos. Se debe observar un precipitado color marrón.
- 9.- Centrifugar 5 minutos a 2000 G. se obtendrá un botón compacto color café oscuro.
- 10.- Trasvasar el sobrenadante (aproximadamente 700 microlitros) a un nuevo tubo con 600 microlitros de isopropanol.
- 11.- Mezclar por inversión hasta hacer visible el DNA. Almacenar a -20°C.
- 12.- Centrifugar 3 minutos a 2000 G.
- 13.- Desechar el sobrenadante y agregar 1 mililitro de etanol al 70%. Invertir varias veces.
- 14.- Centrifugar 2 minutos a 2000 G.
- 15.- Desechar sobrenadante y agregar 1 mililitro de etanol al 70% e invertir varias veces.
- 16.- Centrifugar 2 minutos a 2000 G.
- 17.- Desechar sobrenadante. Secar el botón de 5-10 minutos. Agregar aproximadamente 150-250 microlitros de solución de hidratación de DNA y agitar 5 segundos en el vortex. Incubar 15-30 minutos en baño maría a 65°C. Almacenar a -20°C.

ANEXO 5

ENSAYO PARA LA GENOTIPIFICACIÓN DE SNP DEL GEN DIO2.

Se utilizaron dos ensayos de genotipificación distintos debido a la naturaleza de las sondas. Ambos con un volumen total de reacción de 20 µl.

Características de las sondas utilizadas.

Polimorfismo	Iniciadores [sonda] iniciador
<i>rs225014</i>	(TTGCCACTGTTGTCACCTCCTTCTG[C/T]ACTGGAGACATGCACCACACTGGAA)
<i>rs12885300</i>	(GCAGAGATTTTAAAATTTTCTTTAG[C/T]CTTTCATTGTCTCTATGCTCTTAA)

Cantidades de reactivo para cada sonda en el ensayo de PCR en tiempo real.

Componente	Para 1 reacción (µl)
<i>rs225014</i>	
Sonda	0.35
Taqman PCR Master Mix	10
DNA	20
<i>Rs12885300</i>	
Sonda	0.75
Taqman PCR Master Mix	10
DNA	40

Programa de ciclado de Rotor Gene Q para la sonda rs225014:

Volumen final de reacción: 20 µl.

Programa (86 MIN):

50°C---2 MIN (INCUBACION UNG)

95°C – 10 min. (ACTIVACION ENZIMA GOLD AMPLITAQ)

92°C – 15 seg }
60°C – 40 seg } 40 x

Acquisition: 1 a 5 (green and yellow) Y ACTIVAR “PERFORM OPTIMISATION BEFORE 1st ACQUISITION”.

Programa de ciclado de Rotor Gene Q para la sonda rs12885300:

Volumen final de reacción: 20 µl.

Programa (93 MIN):

50°C---2 MIN (INCUBACION UNG)

95°C – 10 min. (ACTIVACION ENZIMA GOLD AMPLITAQ)

92°C – 15 seg }
60°C – 50 seg } 40 x

Acquisition: 5 a 10 (green and yellow) Y ACTIVAR “PERFORM OPTIMISATION BEFORE 1st ACQUISITION”.