



Revisión

Genética de la artrosis

Cristina Rodríguez-Fontenla* y Antonio Gonzalez

Laboratorio de Investigación 10, Rheumatology Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, La Coruña, España



INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 4 de marzo de 2014
Aceptado el 13 de mayo de 2014
On-line el 1 de julio de 2014

Palabras clave:

Artrosis
Genética
Enfermedades complejas
Estudios de asociación de genoma completo (GWAS)

Keywords:

Osteoarthritis
Genetics
Complex diseases
Genome-wide association studies (GWAS)

R E S U M E N

La artrosis (OA) es una enfermedad compleja en la que diferentes factores ambientales interactúan con múltiples factores genéticos. Esta revisión se centra en los estudios que han contribuido a descubrir los factores genéticos de susceptibilidad a la OA. También se tratan con detalle los *loci* más relevantes en la actualidad, como *GDF-5*, el *locus* en el cromosoma 7q22, *MCF2L*, *DOT1L*, *NCOA3* y los provenientes del estudio arcOGEN. Además, se discuten las diferentes aproximaciones que pueden servir para minimizar los problemas específicos del estudio de la genética de la OA. Entre ellas se encuentran la estandarización de los fenotipos, el estudio de microsatélites y también el uso de otras estrategias de estudio, como metaanálisis de GWAS y análisis basados en genes. Mediante estos nuevos enfoques se espera contribuir al descubrimiento de nuevos factores genéticos de susceptibilidad a la OA.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Genetics of osteoarthritis

A B S T R A C T

Osteoarthritis (OA) is a complex disease caused by the interaction of multiple genetic and environmental factors. This review focuses on the studies that have contributed to the discovery of genetic susceptibility factors in OA. The most relevant associations discovered until now are discussed in detail: *GDF-5*, 7q22 locus, *MCF2L*, *DOT1L*, *NCOA3* and also some important findings from the arcOGEN study. Moreover, the different approaches that can be used to minimize the specific problems of the study of OA genetics are discussed. These include the study of microsatellites, phenotype standardization and other methods such as meta-analysis of GWAS and gene-based analysis. It is expected that these new approaches contribute to finding new susceptibility genetic factors for OA.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas: ADNmt, ADN mitocondrial (*mitochondrial DNA*); *ALDH1A2*, retinaldehído deshidrogenasa 2 (*retinaldehyde dehydrogenase 2*); *ASTN2*, astrotactina 2 (*astrotactin-2*); BMI, índice de masa corporal (*body mass index*); BMP, proteína morfogenética ósea (*bone mineral protein*); *CHST11*, condroitin 4-sulfotransferasa 11 (*chondroitin 4-sulfotransferase 11*); *COG5*, subunidad 5 del complejo oligomérico conservado de Golgi (*conserved oligomeric Golgi complex subunit 5*); *DIO-2*, yodotironina deiodinasa de tipo 2 (*type II iodothyronine deiodinase*); *DOT1L*, histona H3 metiltransferasa o similar a *DOT1* (*DOT1-like*); *DUS4L*, dihidrouridina sintasa 4 similar (*dihydrouridine synthase 4-like*); *DVWA*, *double von Willebrand factor A domains*; *ENCODE*, *ENCyclopedia Of DNA Elements*; *FILIP1*, proteína 1 de interacción con filamina A (*filamin-A-interacting protein 1*); *FTO*, gen asociado a la grasa y obesidad (*fat mass and obesity-associated*); GBA, análisis basado en genes (*gene-based analysis*); *GDF-5*, factor de crecimiento y diferenciación 5 (*growth differentiation factor-5*); *GLT8D1*, *glycosyltransferase 8 domain containing 1*; *GNL3*, proteína 3 de unión al nucleótido guanina (*guanine nucleotide-binding protein-like 3*); *GPR22*, *G protein-coupled receptor 22*; GWAS, estudio de asociación de genoma completo (*genome-wide association study*); *HBP1*, *HMG-box transcription factor 1*; *HLA*, antígeno leucocitario humano (*human leukocyte antigen*); *IL-1*, interleucina 1 (*interleukin 1*); *IL4-R*, receptor de interleucina 4 (*IL-4 receptor*); JSW, anchura del espacio mínimo articular (*joint space width*); LD, desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*); LDH, hernia de disco lumbar (*lumbar disc herniation*); MAF, frecuencia del alelo menor (*minor allele frequency*); *MATN3*, matrilina 3 (*matrilin-3*); *MCF2L*, *MCF.2 cell line derived transforming sequence-like*; *NCOA3*, *nuclear receptor coactivator 3*; OR, odds ratio; *PRKAR2B*, proteína quinasa reguladora 2B dependiente de AMPc (*cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit*); *PTGS-2*, prostaglandina endoperoxidasa sintasa 2 (*prostaglandin-endoperoxide synthase 2*); *PTH1LH*, hormona similar a la hormona paratiroides (*parathyroid hormone-like hormone*); *SENP6*, *SUMO1/sentrin specific peptidase 6*; SNPs, polimorfismos de un único nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*); *SUPT3H*, *suppressor of Ty3 homolog*; *TRPV1*, receptor de potencial transitorio V1 (*transient receptor potential cation channel*); VNTR, número variable de repeticiones en tándem (*variable number of tandem repeats*); 3'UTR, región 3' no traducida (*3' untranslated region*); 5'UTR, región 5' no traducida (*5' untranslated region*).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mcgrisfon@gmail.com (C. Rodríguez-Fontenla).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2014.05.004>

1699-258X/© 2014 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Estudios genéticos en la artrosis

Los primeros estudios que han permitido mostrar el componente genético de la artrosis (OA, *osteoarthritis*) han sido los estudios de gemelos, de riesgo relativo entre hermanos y de agregación familiar. Todos estos trabajos permiten obtener una estimación de la heredabilidad, que cuantifica la importancia de los factores genéticos en la enfermedad. Las estimaciones de heredabilidad en la OA varían en función de los diferentes estudios consultados. Sin embargo, se puede decir que la heredabilidad de la OA de rodilla es del 40%, la de la mano se sitúa en torno al 65% y la de OA de cadera alrededor del 60%. La OA de columna presenta la heredabilidad más elevada, del 70%¹. Estos trabajos han dado paso a otros estudios orientados a descubrir los factores genéticos de susceptibilidad a OA.

Estudios de ligamiento

Los estudios de ligamiento evalúan la cosegregación de marcadores genéticos con la enfermedad en familias con múltiples casos de OA. El ligamiento se observa cuando varios familiares afectos comparten la misma variante alélica para un marcador. Una vez localizada la región genética que segrega con la enfermedad, esta se satura con más marcadores hasta que la región de ligamiento se acorte y los genes se puedan priorizar por su función. Los estudios de ligamiento en OA se llevaron a cabo en diferentes cohortes con distinto fenotipo. En OA de mano se realizaron los estudios de Framingham (EE.UU.), Islandia y Finlandia. En OA de rodilla y/o mano los principales trabajos fueron los de Reino Unido y el estudio GARP (Holanda). De esta forma se identificaron diversas regiones de ligamiento en las que se seleccionaron a posteriori los genes candidatos más probables para realizar estudios de asociación caso-control e identificar los polimorfismos asociados. De esta forma se identificaron como genes posiblemente implicados en OA *MATN3*, *IL4-R* y el cluster de *IL-12-4*. Sin embargo, la mayor parte de estos *loci* no han sido confirmados posteriormente. La dificultad en progresar desde ligamiento a identificación de genes de susceptibilidad se debe a que las regiones de ligamiento son normalmente muy extensas e identificar la variante de susceptibilidad es complicado. Además, los *loci* detectados tienen un efecto débil y el tamaño de las colecciones de muestras utilizadas fue pequeño, por lo que es posible que muchos hallazgos fuesen falsos positivos.

Estudios de genes candidatos

Los estudios de genes candidatos toman como base de partida los conocimientos sobre la patogenia de la OA y seleccionan genes que por su papel funcional podrían ser relevantes en la susceptibilidad a la enfermedad. De esta forma, los genes candidatos estudiados en OA son genes que codifican para componentes de la matriz extracelular, para proteínas reguladoras del anabolismo o catabolismo de la matriz extracelular y para mediadores inflamatorios. Una vez seleccionados los genes, se realizan estudios de asociación caso-control en los que se comparan las frecuencias alélicas de los polimorfismos de interés, en individuos con OA no emparentados y controles libres de la enfermedad. Una de las características de estos estudios es que tienen la capacidad de detectar efectos pequeños con facilidad. Además, es más fácil obtener colecciones de muestras de un tamaño relativamente grande. Los estudios de genes candidatos detectaron mayoritariamente asociaciones que no se confirmaron posteriormente en los GWAS, como: *PTGS-2*, *DIO-2* o *FRZB*⁵⁻⁷. Solo uno de los hallazgos de estos estudios, *GDF-5*, ha sido replicado posteriormente alcanzando el umbral de significación requerido en los GWAS^{8,9}.

Estudios de asociación de genoma completo

Los GWAS permiten estudiar toda la variabilidad genética del genoma sin hipótesis previa gracias a la existencia de desequilibrio de ligamiento (LD). La organización del genoma en bloques de LD permite obtener una representación de una región genómica seleccionando algunos SNPs informativos (tagSNPs). Los tagSNPs característicos de una región se conocen gracias al proyecto Hap-Map que estudió gran número de SNPs en diferentes poblaciones. Basándose en esta información, los *arrays* de genotipado de alta densidad proporcionan una cobertura casi completa de la variabilidad del genoma. Los *arrays* utilizados en la mayoría de los GWAS de OA contienen 500.000 SNPs y en el caso del estudio arcOGEN, el más potente realizado en OA, se utilizó un *array* que cubre 610.000 SNPs^{10,11}. Una de las características principales de los GWAS es el umbral de significación considerado tras corregir por test múltiples ($p < 5 \times 10^{-8}$). Este umbral viene dado por la estimación de que existen aproximadamente 10^6 SNPs independientes en el genoma humano ($0,05/10^6 = 5 \times 10^{-8}$) y tiene la ventaja de reducir la tasa de falsos positivos. Esta exigencia en el umbral de significación permite obtener resultados sólidos y, por tanto, replicables al precio de no descubrir otros factores genéticos con efecto más modesto. Este nivel de exigencia ha sido un gran estímulo para el desarrollo de estudios colaborativos y de metaanálisis para aumentar la potencia estadística a través del aumento del tamaño de las colecciones de muestras. La potencia de un GWAS depende además de la magnitud del efecto de los SNPs causal y de la frecuencia de sus alelos. Gracias a los GWAS y a los metaanálisis de GWAS se han ido descubriendo genes de susceptibilidad a OA, aunque el número de *loci* es relativamente bajo en comparación con otras enfermedades complejas. Los primeros hallazgos sólidos fueron el gen *GDF-5*, el locus 7q22 y *MCF2L*^{9,12,13}. Más recientemente se han incorporado los *loci* descubiertos en el estudio arcOGEN (*GNL3*, *GLT8D1*, *ASTN2*, *FILIP1-SENPA6*, *KLHDC-5-PTHLH*, *CHST11*, *TP63* y *SUPT3H-CDC5L*) y otros *loci* como *DOT1L*, *NCOA3* y *ALDH1A2*^{11,14-16}. Se sospecha que la heterogeneidad de fenotipos de OA, el insuficiente tamaño de las colecciones de muestras disponibles y el mismo diseño de los GWAS pueden haber contribuido a estos resultados insuficientes. Todos estos factores se tratan en detalle a continuación.

Problemas específicos del estudio de la genética de la artrosis

Uno de los problemas que se plantea en el estudio genético de la OA es la heterogeneidad de fenotipos de la OA y cómo han sido considerados en los diferentes estudios que después se combinan en metaanálisis u otros estudios colaborativos. Esta variabilidad reduce el poder estadístico de los estudios de asociación. Por ello, recientemente se ha recomendado una estandarización de los fenotipos de los pacientes para futuros GWAS. Se recomienda estratificar los análisis por edad, sexo, BMI y presencia de OA radiográfica o sintomática. Dentro de la OA radiográfica (ROA) se deben definir los fenotipos en función de otra serie de características como el número de osteófitos (ROA de rodilla y mano) y la presencia de estrechamiento articular (ROA de cadera)¹⁷. Otra forma de aumentar el poder de detección de nuevas variantes es centrar los GWAS en el estudio de endofenotipos, que son fenotipos más próximos a la etiología biológica de la enfermedad que la enfermedad con su espectro de signos y síntomas. Se considera que los endofenotipos permiten obtener grupos de pacientes más homogéneos y tienen una relación más directa con los factores genéticos. De esta forma la potencia de los estudios puede aumentarse. El problema es la necesidad de obtener colecciones de muestras donde se hayan estudiado. En OA, los endofenotipos son características del cartílago o la forma de la articulación. Un ejemplo de endofenotipo es la anchura

del espacio articular (JSW). Su utilización en un GWAS llevó al descubrimiento de un gen de susceptibilidad a OA de cadera, *DOT1L*¹⁴. Otro endofenotipo, el dolor en la articulación, ha permitido descubrir *PACE-4* y *TRPV1* como posibles *loci* asociados, aunque todavía no se ha llegado para ellos a una evidencia significativa a nivel de GWAS^{18,19}.

Pero no solo la selección de los pacientes es importante, también la definición de los controles. La OA es una enfermedad de inicio tardío y de gran prevalencia en la población, por lo que el uso de controles poblacionales sin seleccionar es muy discutido. Si los casos que se incluyen en los estudios genéticos están seleccionados por criterio radiográfico sería ideal que también lo estuvieran los controles. Sin embargo, el diseño de los estudios no siempre lo permite debido a la dificultad que representa en muchas ocasiones justificar una exploración radiográfica en individuos sanos. En la primera fase del estudio arcOGEN se evaluó cómo influye utilizar controles poblacionales o controles libres de OA en los resultados de los GWAS. Los controles libres de OA de este estudio, también denominados «supercontroles», son controles de la colección de gemelos de Twins UK, libres de OA y seleccionados radiográficamente según una escala de Kellgren-Lawrence < 2. De todos los *loci* de susceptibilidad para OA analizados en el estudio de arcOGEN, solo *GDF-5* mostró un efecto mayor y un valor de *p* más significativo al utilizar controles libres de OA. En el resto de los SNPs analizados se obtuvieron resultados idénticos o en algunos casos mejores, al utilizar los controles poblacionales. Debido a ello, se concluyó que utilizar controles libres de OA no produce una mejoría detectable en los resultados de asociación. Sin embargo, este resultado no puede considerarse definitivo, ya que muchas de estas asociaciones se habían descubierto utilizando controles poblacionales²⁰.

Las poblaciones incluidas en el estudio son otra fuente de heterogeneidad. Se ha comprobado que un mismo factor genético no tiene igual efecto en la susceptibilidad a la enfermedad en distintas poblaciones. Esto se refleja claramente en los estudios genéticos realizados en poblaciones europea y asiática. Así, las asociaciones a nivel de GWAS de *HLA de clase II/III* y *DVWA* son específicas de población japonesa y no se replicaron en diferentes estudios realizados en población europea. También hay que tener en cuenta que los factores genéticos de susceptibilidad son específicos de articulación (OA de rodilla, cadera y mano) y de sexo. Esta compartimentalización dificulta reunir colecciones de muestras de gran tamaño. Precisamente, el tamaño de las colecciones disponibles en OA es también un factor limitante. Por ejemplo, el metaanálisis que identificó la asociación del *locus* 7q22 con OA de rodilla incluía un total de 6.709 casos y 35.909 controles. Sin embargo, el poder estadístico de este estudio para descubrir variantes de efectos pequeños (*OR* = 1,10-1,15) no es suficiente. Se necesitarían 7.000 muestras más de OA de rodilla para detectar el efecto de SNPs con una frecuencia de alelo menor (*MAF*) = 20% y una *OR* de 1,15. Luego, las colecciones de muestras disponibles no son suficientes para identificar efectos modestos.

La mayor parte de los estudios de asociación en artrosis son estudios de asociación caso-control, aunque también se han realizado estudios de cohortes. En ellos se hace un seguimiento de un grupo representativo de la población a lo largo del tiempo evaluándose la aparición de nuevos casos de OA. Las características positivas de estos estudios son su representatividad, el control de la recogida de la información según protocolos establecidos y la ausencia de sesgos, ya que los parámetros demográficos y ambientales están claramente definidos y son comunes a los casos y los controles. Sin embargo, su principal limitación es la dificultad de iniciar el estudio con un gran número de individuos a los que hay que realizar un seguimiento a lo largo de muchos años para conseguir un número suficiente de casos.

Por otra parte, los GWAS tienen otras limitaciones que vienen dadas por la cobertura incompleta proporcionada por los *arrays* de

genotipado. Los SNPs con frecuencia < 5%, que presentan un LD muy débil con otros SNPs, no se estudian de manera fiable. Esta falta de cobertura es más marcada para las variantes genéticas raras (con *MAF* < 0,5%), algunas variantes de número de copias (VNTR) complejas, y los microsatélites que tienen múltiples alelos y un alto nivel de mutación en la población²¹. Otra de las limitaciones de los GWAS, esta vez en la interpretación de los resultados, es que los SNPs asociados no tienen por qué ser las variantes causales de la enfermedad. En los últimos años se ha desarrollado la tecnología que permite resecuenciación del genoma, o de la parte del genoma que se expresa como proteínas (el exoma), y es posible que de esta forma se pueda recuperar toda la información perdida en los GWAS con *arrays* de SNPs y que sea más fácil identificar los polimorfismos causales del aumento de susceptibilidad. Este último objetivo también se ha facilitado con el proyecto ENCODE (*ENCYCLOPEDIA OF DNA ELEMENTS*), que proporciona información sobre la funcionalidad de todos los segmentos del genoma humano²².

En resumen, se pueden considerar 2 grandes grupos de *loci* asociados con OA:

- 1 *Loci* posiblemente asociados con OA pero que no han alcanzado el nivel de asociación requerido en los GWAS (tabla 1).
- 2 *Loci* que han alcanzado el nivel de asociación de los GWAS ($p < 5 \times 10^{-8}$) y que, por lo tanto, son los más consistentemente asociados con OA (tabla 2).

Factores genéticos de susceptibilidad a la artrosis

En este apartado se tratan los *loci* asociados con OA más relevantes.

GDF-5, el único gen candidato que se ha confirmado

GDF-5 fue el primer *locus* asociado a nivel de GWAS en europeos y asiáticos. Un estudio en población japonesa descubrió la asociación de un SNP (*rs143383*, C/T) en la región 5'UTR del gen. Esta asociación se observó con OA de cadera ($p = 1,8 \times 10^{-13}$) y con menor magnitud con OA de rodilla⁸. Estudios posteriores confirmaron la asociación de *rs143383* en asiáticos y en europeos. Además, en un metaanálisis de cohortes europeas y asiáticas se encontró asociación de *rs143383* a nivel de GWAS con OA de rodilla ($p = 6,2 \times 10^{-11}$)^{9,23}. Se debe destacar que este mismo SNP se encontró asociado con diversos fenotipos más o menos relacionados con OA como displasia de cadera, tamaño óseo, riesgo de fractura vertebral en mujeres y con la altura^{24,25}. En relación con el papel funcional de este gen, ya era bien conocido que *GDF-5* es un miembro de la familia de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) que tiene una participación clave en el desarrollo del esqueleto, la condrogénesis, la formación de las articulaciones diartroideas, y también en los procesos de reparación del hueso y del cartílago^{26,27}. El SNP *rs143383* influye en la actividad transcripcional de *GDF-5* con uno de sus alelos, el alelo T asociado con OA, mostrando una expresión disminuida en el cartílago. Con posterioridad se han identificado otros 2 polimorfismos en *GDF-5* que modifican su expresión y que contribuyen a su asociación con OA, ya que están en LD con *rs143383*²³. La expresión de *GDF-5* también está modificada por una serie de reguladores en *trans* que interactúan con el *rs143383* en la región 5'UTR y además es un *locus* sujeto a regulación epigenética^{28,29}. Sin duda, *GDF-5* es el factor genético más consistentemente demostrado en los estudios genéticos de OA y con un papel funcional más claramente establecido en la biología del cartílago articular.

Tabla 1
Loci asociados con artrosis que no alcanzan el nivel de asociación requerido en los GWAS

Loci	Polimorfismos	P	Fenotipo	Sexo
ASPN	VNTR (alelo D14)	$6,6 \times 10^{-6}$ (asiáticos)/ $0,016$ (europeos)	Rodilla	-
BMP-5	Microsatélite D6S1276	$0,018$ (cadera)/ $3,1 \times 10^{-4}$ (rodilla)	Cadera y rodilla	Mujeres
PTGS-2	rs4140564	$6,9 \times 10^{-7}$	Rodilla	-
MICAL3	rs2277831	$2,3 \times 10^{-5}$	Cadera y rodilla	-
COL11A1	rs2615977	$1,1 \times 10^{-5}$	Cadera	-
	rs1241164	$5,3 \times 10^{-6}$	Cadera	-
	rs4907986	$5,8 \times 10^{-5}$	Cadera	-
VEGF	rs833058	$2,6 \times 10^{-5}$	Cadera	Hombres
c6orf130	rs11280	$3,2 \times 10^{-5}$	Rodilla	-
PACE-4	rs900414	$4,3 \times 10^{-5}$	Rodilla sintomática	-
TRIB1	rs4512391	$1,1 \times 10^{-6}$	Rodilla	-
FAM154A	rs4977469	$1,2 \times 10^{-6}$	Cadera	-
MATN3	rs8176070	$0,004$	Mano	-
SMAD3	rs12901499	$7,5 \times 10^{-6}$ (cadera)/ $4,0 \times 10^{-4}$ (rodilla)	Cadera y rodilla	-
TRPV1	rs8065080	$3,9 \times 10^{-4}$	Rodilla sintomática	-
DIO2	rs225014/rs12885300	$2,02 \times 10^{-5}$ (haplotipodos SNPs)	Cadera	Mujeres
DIO3	rs945006	$0,004$	Cadera y rodilla	-
A2BP1	rs716508	$1,81 \times 10^{-5}$	Mano	-
CALM1	rs12665715	$9,8 \times 10^{-7}$	Cadera	-
FRZB	rs288326/rs7775	$0,004$ (haplotipodos SNPs)	Cadera	Mujeres
TP63	rs12107036	$6,71 \times 10^{-8}$	TKR	Mujeres
FTO	rs8044769	$6,85 \times 10^{-8}$	Rodilla y cadera	Mujeres
SUPT3H/CDC5L	rs10948172	$7,92 \times 10^{-8}$	Rodilla y cadera	Hombres
HMG3	rs1577792	$7,8 \times 10^{-5}$	Cadera	-
IFRD1	rs5009270	9×10^{-7}	Cadera	-
DNAH10	rs10773046	2×10^{-4}	Cadera	-
NACA2	rs17610181	$1,3 \times 10^{-5}$	Cadera	-
DYRK2	rs10878630	$3,9 \times 10^{-4}$	Cadera	Mujeres
PHF2	rs12551314	$2,9 \times 10^{-4}$	Cadera	Hombres
CAM2KB	rs3757837	$2,2 \times 10^{-6}$	Cadera	Hombres

TKR: reemplazamiento articular total de rodilla.

Se resaltan en negrita los loci que se encuentran cerca del umbral de asociación de los GWAS ($p < 5 \times 10^{-8}$) en europeos. Estos loci proceden del estudio arcOGEN y del reciente metaanálisis de OA de cadera. Evangelou et al¹⁵ hace referencia al metaanálisis de OA de cadera no a la tabla

El locus del cromosoma 7q22 con sus 6 genes

El segundo locus que se encontró asociado a nivel de GWAS en europeos es el locus del cromosoma 7q22. Es un locus muy extenso que ocupa unas 500 kb, y contiene 400 SNPs y 6 genes diferentes: *PRKAR2B*, *HBPI1*, *COG5*, *GPR22*, *DUS4L* y *BCAP29*. La asociación de este locus con OA de rodilla se descubrió en un GWAS que después de diferentes fases de estudio de 500.000 SNPs llevó a solo un SNP, rs3815148, con asociación a nivel de GWAS ($OR = 1,14$, $p = 8 \times 10^{-8}$)¹⁰. Posteriormente se realizó un metaanálisis con los datos de 4 GWAS de población europea seguido de una replicación en 9 colecciones europeas adicionales. En este estudio, rs4730250 (*DUS4L*) fue el SNP más asociado tanto en la fase inicial

como en el análisis global de todas las colecciones ($OR = 1,17$, $p = 9,2 \times 10^{-9}$)³⁰. Los estudios funcionales del locus se centraron en descubrir cuál de los 6 genes podría ser el mejor candidato funcional. En principio todo parecía indicar que era *GPR22*, debido a que un SNP localizado antes del gen y en elevado ligamiento con rs3815148 se asoció con cambios en la expresión del gen en linfoblastos. Sin embargo, su papel ha sido cuestionado con posterioridad porque parece que no se expresa casi en condrocitos humanos en cultivo y tampoco en muestras de cartílago. En contraste con estos datos, la inmunohistoquímica muestra expresión de *GPR22* en los condrocitos de la capa superficial de ratones con OA, y la sobreexpresión de *GPR22* in vitro estimula el proceso hipertrófico de los condrocitos y acelera la calcificación³¹. Experimentos

Tabla 2
Loci asociados en artrosis que alcanzan el nivel de asociación requerido en los GWAS

Loci	SNPs	p ^a	Fenotipo	Sexo	Población
GDF-5	rs143383	$6,2 \times 10^{-11}$ (europeos)/ $1,8 \times 10^{-13}$ (asiáticos)	Rodilla	-	Europeos y asiáticos
locus 7q22	rs4730250	$9,2 \times 10^{-9}$	Rodilla	-	Europeos
MCF2L	rs11841874	2×10^{-8}	Rodilla y TJR cadera	-	Europeos
NCOA3	rs6094710	$7,9 \times 10^{-9}$	Cadera	-	Europeos
HLA clase II/III	rs7775228	$2,4 \times 10^{-8}$	Rodilla	-	Asiáticos/no europeos
	rs10947262	$6,7 \times 10^{-8}$			
DVWA	rs7639618	$7,3 \times 10^{-8}$	Rodilla	-	Asiáticos/no europeos
DOT1L	rs1298744	$1,1 \times 10^{-11}$	JSW de cadera y OA cadera	Hombres	Europeos
ALDH1A2	rs3204689/rs3204689	$1,1 \times 10^{-11}$ /8,6 $\times 10^{-11}$	Mano	-	Europeos
GNL3/GLT8D1	rs6976/rs11177	$7,24 \times 10^{-11}$ /1,25 $\times 10^{-10}$	TJR	-	Europeos
ASTN2	rs4836732	$6,11 \times 10^{-10}$	TJR cadera	Mujeres	Europeos
FILIP1/SEN6	rs9350591	$2,42 \times 10^{-9}$	Cadera	-	Europeos
KLDHC5/PTHLH	rs10492367	$1,48 \times 10^{-8}$	Cadera	-	Europeos
CHST11	rs835487	$1,64 \times 10^{-8}$	TJR	-	Europeos

JSW: anchura del espacio articular; TJR: reemplazamiento articular total.

En negrita se marcan los loci del estudio arcOGEN.

^a Para GDF-5 se muestra el valor p de asociación con OA de cadera en asiáticos. Todos los estudios posteriores en población europea replicaron la asociación en OA de rodilla.

más recientes han priorizado *HBP1* como el mejor gen para explicar la asociación. Se llegó a esta conclusión analizando la expresión alélica diferencial de los 6 genes en cartílago de pacientes con OA. Este gen es importante en la ruta de señalización Wnt³². Sin embargo, esta cuestión no puede considerarse resuelta y nadie ha propuesto todavía un mecanismo detallado como el descrito para *GDF-5*.

El estudio arcOGEN (fases 1 y 2) y sus 5 loci

El proyecto arcOGEN es el más ambicioso realizado hasta el momento en el campo y constituye un gran esfuerzo para el esclarecimiento de las bases genéticas de susceptibilidad a la OA. En la primera fase se estudiaron 3.177 casos (OA de rodilla y cadera) y 4.894 controles del Reino Unido. Esta fase llevó a la identificación de algunos loci asociados, ninguno de ellos a nivel de GWAS y ninguno de ellos confirmado con posterioridad. Sin embargo, esta fase de arcOGEN fue utilizada para analizar la estructura genética de la OA, y este resultado sí que es interesante. Esta estructura es la de una enfermedad poligénica, como la de la mayoría de las enfermedades complejas, y no oligogénica, como se había postulado antes del inicio de los GWAS. Esto significa que muy probablemente hay muchos polimorfismos asociados, cada uno de ellos con un efecto pequeño en la predisposición a la enfermedad y que además están repartidos de una forma homogénea por todo el genoma. En contraste con otras enfermedades complejas en las que muchos polimorfismos con pequeño efecto se encuentran junto a unos pocos de efecto marcado, en la OA no se ha encontrado ninguna evidencia de polimorfismos de gran efecto.

En la segunda fase de arcOGEN (con un total de 7.410 casos con OA de rodilla y de cadera, y 11.009 controles) se identificaron 5 loci con asociación a nivel de significación de GWAS y otros 3 alcanzando un nivel muy cercano. Constituye, por tanto, el estudio con el que más se ha avanzado en la identificación de factores genéticos de susceptibilidad para la OA. Estos resultados se obtuvieron combinando el GWAS de las muestras de arcOGEN con la replicación *in silico* en un número similar de casos y controles de 6 colecciones europeas y la replicación *de novo* en otra cohorte del Reino Unido. Los 2 SNPs más asociados, rs6976 y rs11177, representan una única señal que está asociada con OA y reemplazamiento articular tanto de la rodilla como de la cadera. Uno de estos SNPs, rs6976, está situado en la región 3'UTR de *GLT8D1*, y el otro, rs11177, es un SNP no sinónimo localizado en el exón 3 de *GNL3*, por lo que cualquiera de estos genes podría ser el responsable de la asociación. Los otros 4 loci que alcanzaron nivel de GWAS estaban asociados con OA de cadera y se han descrito como: *ASTN2*, *FILIP1-SEN6*, *KLHDC5-PTH1H* y *CHST11*, aunque todavía no se han realizado estudios que permitan atribuir causalidad a ninguno de estos genes. Los 3 loci que mostraron asociación cerca del umbral de $p < 5 \times 10^{-8}$ se han descrito como: *TP63*, *FTO* y *SUPT3H-CDC5L*¹¹ (tabla 2). Se debe señalar que, al igual que en la primera fase de arcOGEN, no se replica la asociación de *GDF-5* ni del locus 7q22 a nivel de GWAS, a pesar de que, como se ha señalado, se trata de asociaciones sólidas. Esta falta de replicación se ha atribuido a una combinación de diferentes factores: insuficiente poder estadístico dado el tamaño muestral en la fase de descubrimiento y las frecuencias alélicas de los SNPs y, en *GDF-5*, la ausencia de genotipado de rs143383. Sin embargo, un tagSNPs de rs143383, el rs4911494 ($r^2 = 0,94$), tampoco mostró asociación. De algunos de los loci asociados en la segunda fase de arcOGEN, como *ASTN2*, se desconoce cuál puede ser su función específica en el cartílago articular, si es que la tienen. De otros se sabe algo más, como de *GNL3*, que mostró expresión en las células mesenquimales, precursoras de los condrocitos, y en condrocitos artrósicos. Cerca de los genes *FILIP1-SEN6* se encuentra *COL12A1*, que codifica para una proteína de colágeno que forma parte del entramado de fibras de la matriz extracelular. En relación

con otro locus, el gen *PTH1H* codifica la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), que muestra una expresión elevada en el cartílago de pacientes con OA y participa en el desarrollo del hueso subcondral. *CHST11*, por su parte, codifica una proteína implicada en la síntesis de proteoglicanos, concretamente del sulfato de condroitina. El sulfato de condroitina no solo es un componente del cartílago sino que se utiliza como tratamiento de la OA, aunque su efectividad es discutida³³. Otro de los posibles genes, *TP63*, está relacionado con el desarrollo de la articulación y se ha descrito como uno de los loci que determinan la morfología facial en humanos³⁴. Por su parte, cerca del locus *CDC5L-SUPT3H* se encuentra *RUNX-2*, que es esencial tanto en la diferenciación de los osteoblastos como en la morfogénesis del esqueleto. Ninguno de los loci anteriores ha sido todavía estudiado más allá de su descripción como asociado. El único que ha sido objeto de un estudio posterior es el locus caracterizado por contener al gen *FTO*. Este gen se había asociado con anterioridad con obesidad y se había demostrado que predisponía al aumento de peso por mecanismos no totalmente aclarados pero que incluirían regulación de la ingesta o de la producción de energía. Esto hizo sospechar que la asociación con la OA fuese secundaria a la asociación con obesidad, ya que la obesidad es un factor de riesgo importante para la OA, especialmente para la OA de rodilla. Al analizar esta posibilidad se observó que la asociación de *FTO* con OA desaparecía tras ajustar por el BMI, lo que vuelve a sugerir una etiología genética común y resalta la importancia de la estratificación por BMI en los estudios genéticos de OA³⁵.

COL11A1

De entre las asociaciones propuestas en la primera fase de arcOGEN y no confirmadas con posterioridad, el gen *COL11A1* es el más prometedor. Esto se debe al papel funcional de este gen que codifica para una de las 3 fibrillas que forman la molécula de colágeno de tipo XI. Este colágeno se une a los agregados de proteoglicanos y los ancla a la red de colágeno de la matriz extra celular³⁶. Pero también resalta porque algunas mutaciones en este gen dan lugar a síndromes hereditarios que incluyen en su espectro de manifestaciones OA de inicio temprano³⁷. Una evidencia más indirecta es su asociación con hernia de disco lumbar (LDH) en japoneses, ya que la biología del disco intervertebral y del cartílago articular están relacionadas. La expresión de *COL11A1* disminuye en el disco intervertebral de pacientes con LDH y con el alelo de susceptibilidad a LDH (aleloC) del SNP asociado rs1676486³⁸. Sin embargo, rs1676486 no está asociado con OA, aunque sí lo está con la expresión de *COL11A1* en cartílago artrósico. Por si esto no fuera suficientemente paradójico, el SNP de *COL11A1* más asociado con OA en el estudio arcOGEN fase 1, rs2615977, no muestra ninguna asociación con la expresión del gen en el cartílago³⁹. Es posible que un reciente metaanálisis de 9 GWAS de artrosis haya proporcionado pistas para poder explicar estos resultados, ya que mostró asociación independiente de 2 SNPs de *COL11A1* con OA de cadera localizados en los extremos del gen⁴⁰. Por lo tanto, es posible que las paradojas de los estudios previos se resuelvan al considerar la posibilidad de 2 asociaciones independientes, ninguna de ellas completamente coincidente con las estudiadas funcionalmente hasta ahora.

DOT1L y artrosis de cadera

Como ya se ha comentado, la asociación de *DOT1L* se descubrió al estudiar un endofenotipo de OA de cadera, la anchura del espacio articular (JSW). Aunque se ha utilizado como un ejemplo de la eficacia del uso de endofenotipos, hay que hacer notar que es el único locus descubierto en el GWAS que lo usó, lo que

no deja de ser un rendimiento pobre para un estudio como el de la cohorte de Rotterdam (6.523 sujetos) analizando una variable cuantitativa (que normalmente proporciona más potencia que una variable dicotómica). Con posterioridad se ha demostrado que el mismo SNPs de *DOT1L* está asociado con OA de cadera en hombres ($p = 7,8 \times 10^{-9}$) en un estudio con elevado tamaño muestral. *DOT1L* es una metiltransferasa de histonas que interactúa con TCF-4 regulando la transcripción de los genes de la ruta Wnt e influenciando la diferenciación condrogénica, se expresa en el cartílago de los pacientes con OA y su supresión inhibe la acumulación de proteoglicanos y de cartílago durante la condrogénesis¹⁴.

MCF2L ayudado por los estudios de resecuenciación del genoma

Otro análisis reciente descubrió la asociación de *MCF2L* con OA de cadera. Este estudio utilizó la información del Proyecto 1000 Genomas para obtener la suficiente confianza para afirmar esta asociación. El Proyecto 1000 Genomas pretende proporcionar un catálogo completo de toda la variación genética que alberga el genoma humano. Mediante secuenciación de última generación seguida de distintas etapas de genotipado y validación, se catalogan variantes comunes, variantes de baja frecuencia (0,5-5%) y variantes raras (<0,5%). Esta información se utilizó para imputar SNPs y variantes raras que no se habían genotipado en el GWAS de la fase 1 de arcOGEN. La comparación entre casos y controles de más de 7 millones de variantes con frecuencia > 1% llevó a seleccionar 8 SNPs en 6 loci para genotipar directamente en las muestras del GWAS original. De esta forma se encontraron nuevos SNPs asociados en *MCF2L*, donde solo se había encontrado rs11841874, por lo que se había considerado un resultado dudoso y no se había proseguido su investigación. Una vez que se aumentó la confianza en este resultado se analizó en otras cohortes, llevando a una asociación significativa a nivel de GWAS (p metaanálisis = 2×10^{-8}). Poco se sabe sobre el papel funcional de *MCF2L* más allá de que participa en la regulación de la neurotrofina-3 que pertenece a la familia NGF, un factor pro-angiogénico cuya expresión se encuentra aumentada en condrocitos artrósicos¹³.

NCOA3 y artrosis de cadera

En un metaanálisis de GWAS de OA de cadera se descubrió la asociación del rs6094710 ($p = 7,9 \times 10^{-9}$). Este estudio reunió un total de 4.349 casos de OA de cadera y 46.903 controles en la fase de descubrimiento y 11.277 casos y 67.473 controles en la replicación, por lo que es el mayor realizado hasta ahora. El SNPs rs6094710 se encuentra cerca de *NCOA3*, que es un gen con expresión disminuida en cartílago artrósico. Además, rs6094710 está en LD con un SNPs no sinónimo (Arg>Cys) que es probablemente dañino para una variante de la proteína, lo que apunta a un posible mecanismo molecular. *NCOA3* podría tener un papel en el metabolismo del hueso, ya que es un coactivador de varios receptores nucleares como los de retinoides, de la vitamina D o de la hormona tiroidea (T3). Aunque también es posible que *NCOA3* participe en el proceso de mecanotransducción de los condrocitos¹⁵.

DVWA y *HLA* de clase II/III y artrosis en asiáticos

Los loci *DVWA* y *HLA* de clase II/III muestran asociación a nivel de GWAS pero restringida a población asiática. Son 2 ejemplos de la heterogeneidad genética existente entre europeos y asiáticos. La asociación de *DVWA* con OA de rodilla se identificó en un GWAS en población japonesa⁴¹. Con posterioridad se han realizado 2 estudios específicos de los mismos polimorfismos en población europea, pero ninguno de ellos detectó asociación^{42,43}. La función de este gen ha sido muy poco estudiada. En el trabajo que descubrió su asociación se comprobó que *DVWA* interactúa con la β -tubulina de

manera diferencial dependiendo de los alelos de los 2 SNPs no sinónimos que habían mostrado asociación. Posteriormente ha habido controversia sobre la naturaleza de este gen. Así, se encontraron evidencias de que *DVWA* era en realidad la porción 5' de otro gen, *COL6A4*⁴⁴. Sin embargo, la reciente clonación del gen parece haber encontrado una explicación, ya que reveló 2 isoformas de la proteína, una larga y otra corta. La corta no tiene homología con *COL6A4* y tiene una expresión específica en cartílago. Se ha hipotetizado el posible papel de *DVWA* en la diferenciación de los condrocitos y el tráfico intracelular⁴⁵.

La asociación de HLA se descubrió en un GWAS realizado en población japonesa con OA de rodilla. Había 2 SNPs asociados: rs7775228 en *HLA-DQ1B* y rs10947262 en *BTNL-2* ($p = 2,4 \times 10^{-8}$ y $p = 6,7 \times 10^{-8}$, respectivamente) que están localizados en la región del *HLA* de clase II/III y que no son independientes, representando, por tanto, una única asociación⁴⁶. Estos SNPs no han estado asociados con OA de rodilla en muestras europeas en el mismo estudio o en estudios posteriores^{47,48}. La importancia de esta asociación reside en que podría explicar parte del componente inflamatorio de la OA.

ALDH1A2 y artrosis de mano

Hasta la fecha, *A2BP1* se consideraba el locus más relevante en OA de mano y el rs716508 el SNPs más fuertemente asociado con este fenotipo ($p = 1,81 \times 10^{-5}$)⁴⁹. Sin embargo, recientemente se ha descubierto una nueva asociación a nivel de GWAS con OA de mano¹⁶. En la fase de descubrimiento del estudio, realizada en población islandesa, se encontró un grupo de 55 variantes asociadas ($p < 5 \times 10^{-8}$). Todas ellas se encuentran en un bloque de LD en el cromosoma 15q22 y se clasificaron en 2 grupos considerando la frecuencia del alelo de riesgo (41 y 52%) con 2 SNPs representativos para cada grupo, el rs4238326 y el rs3204689. Las variantes de ambos grupos se testaron en 5 colecciones muestrales europeas adicionales, y el análisis conjunto de ambas fases mostró asociación a nivel de GWAS para el rs4238326 (OR = 1,44; $p = 8,6 \times 10^{-11}$) y el rs3204689 (OR = 1,46; $p = 1,1 \times 10^{-11}$). En relación con el papel funcional del locus, *ALDH1A2* codifica para la retinaldehído deshidrogenasa 2, que cataliza la síntesis de ácido retinoico, molécula con papel relevante en el desarrollo del cartílago y el hueso.

El papel del ADN mitocondrial en la artrosis

Además del genoma nuclear también se ha estudiado el posible papel de los haplogrupos del ADNmt en OA. Cada haplogrupo mitocondrial está definido por una combinación particular de variantes genéticas. En concreto, los haplogrupos J (m.4216T>C, m.10398A>G) y JT (m.4216T>C) se encontraron asociados con un menor riesgo de padecer OA de rodilla y los haplogrupos relacionados J y J1c (m.14798T>C) con un menor riesgo de OA de cadera en españoles^{50,51}. En población asiática también se encontró asociación de otros 2 haplogrupos mitocondriales, G y B/B4, que mostraron un efecto de susceptibilidad y protección, respectivamente⁵². Sin embargo, en el estudio arcOGEN de un tamaño muestral mayor (7.393 casos y 5.122 controles del Reino Unido) no se encontró asociación con ningún haplogrupo de ADNmt⁵³. Se ha sugerido que diferencias en la frecuencia de los haplogrupos en la población de los diferentes estudios (España y Reino Unido) podrían justificar las discrepancias, además de que la falta de replicación en este estudio no constituye una evidencia suficiente, como ya se ha mencionado en relación con los loci *GDF-5* y *7q22*⁵⁴. Se han encontrado otras asociaciones que podrían reforzar la implicación de los haplogrupos mitocondriales en la patogénesis de la OA, como la asociación con los niveles en suero de colágeno de tipo II y metaloproteasas⁵⁵.

Futuro de los estudios genéticos de artrosis

El estudio de los factores genéticos implicados en la susceptibilidad a la OA es un campo que ha progresado notablemente en los últimos años. En la actualidad se puede hablar de 11 *loci* asociados con OA en población europea al nivel requerido en los GWAS y 4 cerca de este nivel. Aun así, el número de genes de susceptibilidad encontrados es relativamente bajo si lo comparamos con otras enfermedades complejas. Los investigadores del campo proponen una serie de estrategias adicionales para aplicar en estudios futuros que ayudarían a completar nuestro conocimiento sobre el componente genético de la OA. Entre ellas se incluyen aumentar el tamaño de los estudios, estandarizar los fenotipos de los pacientes y utilizar la información del Proyecto 1000 Genomas para completar la cobertura de la variación genética. También puede ser útil realizar otros estudios, como los de resecuenciación del genoma, o del exoma, en búsqueda de variantes raras con elevada penetrancia y el estudio de microsatélites y VNTR, que son variantes no estudiadas en los GWAS. Además, también se podría extraer más información de los GWAS ya realizados con nuevas estrategias de estudio, como han sido los metaanálisis de genes candidatos y pueden ser los análisis basados en genes.

En relación con la búsqueda de variantes raras, podría ser de gran interés secuenciar genes ya asociados, pues estos genes pueden portar variantes raras asociadas, como se ha observado en otras enfermedades. Sin embargo, un estudio de este tipo del gen *GDF-5* no encontró ninguna variante rara que contribuya a la susceptibilidad a OA⁵⁶.

En relación con los microsatélites y VNTR, hay 2 que han mostrado asociación con OA en algunos estudios: un VNTR en *ASPN* (asporina) y un microsatélite en el intrón 1 de *BMP-5*. La asociación del VNTR de *ASPN* como un factor genético de susceptibilidad a la OA se detectó en población japonesa. La frecuencia del alelo de 14 repeticiones del VNTR (D14) se encontró elevada en los pacientes con OA de rodilla respecto a los controles ($p=0,000066$). La repetición D13 mostró un efecto menor y de sentido contrario o protector, esto es, que su frecuencia estuvo elevada en controles⁵⁷. Esta asociación no se encontró en población europea, lo que vuelve a demostrar la existencia de un componente étnico diferencial entre ambas poblaciones. Por su parte, el microsatélite de *BMP-5*, D6S1276, mostró asociación ($p=0,018$) con OA de cadera en mujeres del Reino Unido. Además, se mostró que afectaba la actividad transcripcional del gen *in vitro*. Este hallazgo motivó estudios posteriores de *BMP-5*, demostrándose su asociación en otro fenotipo, OA de rodilla en pacientes con artrosis de 3 países europeos^{58,59}. Dado que ni la asociación de *ASPN* ni la de *BMP-5* han alcanzado el nivel de GWAS, no se les ha prestado demasiada atención, pero sugieren que las variantes en el número de copias pueden esconder factores genéticos de OA.

Otra de las aproximaciones mencionadas trata de extraer más información de los GWAS ya realizados. Ya hay gran experiencia demostrando el valor de los metaanálisis. Un complemento es el estudio centrado en conjuntos particulares de genes de los cuáles existe algún tipo de evidencia independiente de participación en la OA. Una aproximación de este tipo ya se ha realizado utilizando como fuente de la evidencia previa los estudios de genes candidatos. Este análisis resaltó la posible asociación con OA de cadera de *COL11A1* y *VEGF*⁴⁰. Otra estrategia que podría ser útil es la de obtener un estadístico combinando las asociaciones independientes de los SNPs de un gen. Esto es lo que se ha denominado *Gene-Based Analysis* (GBA). Se basa en la hipótesis de que múltiples variantes genéticas en genes importantes para la enfermedad podrían contribuir, aunque ninguno lo haga con un nivel suficiente para ser detectado a nivel individual. Se han realizado algunos estudios de este tipo en otras enfermedades, pero sin resultados muy convincentes. Es posible que para

poder realizar este tipo de análisis se requieran nuevas herramientas.

Por lo tanto, aunque los últimos años han traído muchos éxitos en la identificación de *loci* asociados con enfermedades complejas, los investigadores de la OA no estamos satisfechos, pues somos conscientes de que quedan muchos más por identificar. Se ha planteado toda una serie de aproximaciones que pueden ayudarnos a avanzar más en este camino, aunque todavía no está claro cuál de ellas será más fructífera. Es posible, que cada una nos proporcione algunos avances y que solo poco a poco se vaya completando nuestro conocimiento del componente genético de la OA. Otro aspecto en el que hasta ahora solo se han dado los primeros pasos es la identificación de las variantes causales del aumento de susceptibilidad y de los mecanismos sobre los que tienen un efecto. Esta es un área que requiere un desarrollo urgente, pues es donde existen más posibilidades de contribuir al conocimiento y manejo de la enfermedad.

Responsabilidades éticas

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: Genetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12 Suppl A:S39-44.
2. Stefánsson SE, Jónsson H, Ingvarsson T, Manolescu I, Jónsson HH, Olafsdóttir G, et al. Genomewide scan for hand osteoarthritis: A novel mutation in matrilin-3. *Am J Hum Genet*. 2003;72:1448-59.
3. Forster T, Chapman K, Loughlin J. Common variants within the interleukin 4 receptor alpha gene (IL4R) are associated with susceptibility to osteoarthritis. *Hum Genet*. 2004;114:391-5.
4. Leppävuori J, Kujala U, Kinnunen J, Kaprio J, Nissilä M, Heliövaara M, et al. Genome scan for predisposing loci for distal interphalangeal joint osteoarthritis: Evidence for a locus on 2q. *Am J Hum Genet*. 1999;65:1060-7.
5. Valdes AM, Loughlin J, Timms KM, Meurs JJB, van Southam L, Wilson SG, et al. Genome-wide association scan identifies a prostaglandin-endoperoxide synthase 2 variant involved in risk of knee osteoarthritis. *Am J Hum Genet*. 2008;82:1231-40.
6. Meulenbelt I, Min JL, Bos S, Riyazi N, Houwing-Duistermaat JJ, van der Wijk H-J, et al. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet*. 2008;17:1867-75.
7. Loughlin J, Dowling B, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, et al. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:9757-62.
8. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, et al. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet*. 2007;39:529-33.
9. Valdes AM, Evangelou E, Kerkhof HJM, Tamm AA, 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.
10. Kerkhof HJM, Lories RJ, Meulenbelt I, Jonsdottir I, Valdes AM, Arp P, et al. A genome-wide association study identifies an osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 7q22. *Arthritis Rheum*. 2010;62:499-510.
11. Zeggini E, Panoutsopoulou K, Southam L, Rayner NW, Day-Williams AG, Lopes MC, et al. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): A genome-wide association study. *Lancet*. 2012;6736:1-9.
12. Evangelou E, Valdes AM, Kerkhof HJM, Stykarsdottir U, Zhu YY, 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.

13. 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.
14. Castaño MC, Cailotto F, Kerkhof HJ, Cornelis FMF, Castaño Betancourt MC, Doherty SA, et al. Genome-wide association and functional studies identify the DOT1L gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109:1–6.
15. Evangelou E, Kerkhof HJ, Styrkarsdottir U, Ntzani EE, Bos SD, Esko T, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip. *Ann Rheum Dis.* 2013;0:1–7.
16. Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Helgadóttir HT, Bomer N, Metrustry S, Bierma-Zeinstra S, et al. Severe osteoarthritis of the hand associates with common variants within the ALDH1A2 gene and with rare variants at 1p31. *Nat Genet.* 2014;46:498–502.
17. Kerkhof HJM, Meulenbelt I, Akune T, Arden NK, Aromaa A, Bierma-Zeinstra SMA, et al. Recommendations for standardization and phenotype definitions in genetic studies of osteoarthritis: The TREAT-OA consortium. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19:254–64.
18. Malfait A-M, Seymour AB, Gao F, Tortorella MD, Graverand-Gastineau M-PH, Le Wood LS, et al. A role for PACE4 in osteoarthritis pain: Evidence from human genetic association and null mutant phenotype. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:1042–8.
19. 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.
20. Panoutsopoulou K, Southam L, Elliott KS, Wrayner N, Zhai G, Beazley C, et al. Insights into the genetic architecture of osteoarthritis from stage 1 of the arcOGEN study. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:864–7.
21. Gibson G. Rare and common variants: Twenty arguments. *Nat Rev Genet.* 2011;13:135–45.
22. Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, Doyle F, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489:57–74.
23. Southam L, Rodriguez-Lopez J, Wilkins JM, Pombo-Suarez M, Snelling S, Gomez-Reino JJ, et al. An SNP in the 5'-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in allelic expression in articular cartilage. *Hum Mol Genet.* 2007;16:2226–32.
24. Vaes RBA, Rivadeneira F, Kerkhof JM, Hofman A, Pols HAP, Uitterlinden AG, et al. Genetic variation in the GDF5 region is associated with osteoarthritis, height, hip axis length and fracture risk: The Rotterdam study. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:1754–60.
25. Sanna S, Jackson AU, Nagaraja R, Willer CJ, Chen W-M, Bonnycastle LL, et al. Common variants in the GDF5-UQC region are associated with variation in human height. *Nat Genet.* 2008;40:198–203.
26. Storm EE, Kingsley DM. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol.* 1999;209:11–27.
27. Tsumaki N, Tanaka K, Arikawa-Hirasawa E, Nakase T, Kimura T, Thomas JT, et al. Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation. *J Cell Biol.* 1999;144:161–73.
28. Syddall CM, Reynard LN, Young DA, Loughlin J. The identification of trans-acting factors that regulate the expression of GDF5 via the osteoarthritis susceptibility SNP rs143383. *PLoS Genet.* 2013;9:e1003557.
29. Reynard LN, Bui C, Canty-Laird EG, Young DA, Loughlin J. Expression of the osteoarthritis-associated gene GDF5 is modulated epigenetically by DNA methylation. *Hum Mol Genet.* 2011;20:3450–60.
30. Evangelou E, Valdes AM, Kerkhof HJM, Styrkarsdottir 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;70:349–55.
31. Guns L-A, Cailotto F, Lories RJ. A5.6 Cholecystokinin and purinoreceptor antagonists modulate OA-associated GPR22 signalling. *Ann Rheum Dis.* 2014;73 Suppl 1:A65.
32. Raine EVA, 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;71:2020–7.
33. Verbruggen G. Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology.* 2006;45:129–38.
34. Liu F, Lijn F, van der Schurmann C, Zhu G, Chakravarty MM, Hysi PG, et al. A genome-wide association study identifies five loci influencing facial morphology in Europeans. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002932.
35. Elliott KS, Chapman K, Day-Williams A, Panoutsopoulou K, Southam L, Lindgren CM, et al. Evaluation of the genetic overlap between osteoarthritis with body mass index and height using genome-wide association scan data. *Ann Rheum Dis.* 2012;72:935–41.
36. Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 2002;4:30–5.
37. Jakkula E, Melkonieni M, Kiviranta I, Lohiniva J, Rääinä SS, Perälä M, et al. The role of sequence variations within the genes encoding collagen II, IX and XI in non-syndromic, early-onset osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:497–507.
38. Mio F, Chiba K, Hirose Y, Kawaguchi Y, Mikami Y, Oya T, et al. A functional polymorphism in COL11A1, which encodes the alpha 1 chain of type XI collagen, is associated with susceptibility to lumbar disc herniation. *Am J Hum Genet.* 2007;81:1271–7.
39. Raine EVA, Dodd AW, Reynard LN, Loughlin J. Allelic expression analysis of the osteoarthritis susceptibility gene COL11A1 in human joint tissues. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:85.
40. Rodriguez-Fontenla C, Calaza M, Evangelou E, Valdes AM, Arden N, Blanco FJ, et al. Assessment of osteoarthritis candidate genes in a meta-analysis of 9 genome-wide association studies. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:940–9.
41. Miyamoto Y, Shi D, Nakajima M, Ozaki K, Sudo A, Kotani A, et al. Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. *Nat Genet.* 2008;40:994–8.
42. Meulenbelt I, Chapman K, Dieguez-Gonzalez R, Shi D, Tsezou A, Dai J, et al. Large replication study and meta-analyses of DVWA as an osteoarthritis susceptibility locus in European and Asian populations. *Hum Mol Genet.* 2009;18:1518–23.
43. Valdes AM, Spector TD, Doherty S, Wheeler M, Hart DJ, Doherty M. Association of the DVWA and GDF5 polymorphisms with osteoarthritis in UK populations. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:1916–20.
44. Wagener R, Gara SK, Kobbe B, Paulsson M, Zaucke F. The knee osteoarthritis susceptibility locus DVWA on chromosome 3p24.3 is the 5' part of the split COL6A4 gene. *Matrix Biol.* 2009;28:307–10.
45. Nakajima M, Miyamoto Y, Ikegawa S. Cloning and characterization of the osteoarthritis-associated gene DVWA. *J Bone Miner Metab.* 2011;29:300–8.
46. Nakajima M, Takahashi A, Kou I, Rodriguez-Fontenla C, Gomez-Reino JJ, Furuichi T, et al. New sequence variants in HLA class II/III region associated with susceptibility to knee osteoarthritis identified by Genome-Wide Association Study. *PLoS One.* 2010;5:e9723.
47. Shi D, Zheng Q, Chen D, Zhu L, Qin A, Fan J, et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in HLA class II/III region with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18:1454–7.
48. Valdes AM, Styrkarsdottir U, Doherty M, Morris DL, Mangino M, Tamm AA, et al. Large scale replication study of the association between HLA II/BTNL2 variants and osteoarthritis of the knee in European-descent populations. *PLoS One.* 2011;6:e23371.
49. Zhai G, Meurs JBJ, van Livshits G, Meulenbelt I, Valdes AM, Soranzo N, et al. A genome-wide association study suggests that a locus within the ataxin 2 binding protein 1 gene is associated with hand osteoarthritis: The Treat-OA consortium. *J Med Genet.* 2009;46:614–6.
50. 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;58:2387–96.
51. 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.
52. Fang H, Liu X, Shen L, Li F, Liu Y, Chi H, et al. Role of mtDNA haplogroups in the prevalence of knee osteoarthritis in a southern Chinese population. *Int J Mol Sci.* 2014;15:2646–59.
53. Hudson G, Panoutsopoulou K, Wilson I, Southam L, Rayner NW, Arden N, et al. No evidence of an association between mitochondrial DNA variants and osteoarthritis in 7393 cases and 5122 controls. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:136–9.
54. Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Oreiro N, Fernández-López C, Rego-Pérez I, Blanco FJ. mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *Mitochondrion.* 2014;15:18–23.
55. Cillero-Pastor B, Rego-Pérez I, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, Blanco FJ. Mitochondrial respiratory chain dysfunction modulates metalloproteases -1, -3 and -13 in human normal chondrocytes in culture. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:235.
56. Dodd AW, Rodriguez-Fontenla C, Calaza M, Carr A, Gomez-Reino JJ, Tsezou A, et al. Deep sequencing of GDF5 reveals the absence of rare variants at this important osteoarthritis susceptibility locus. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19:430–4.
57. Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, et al. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet.* 2005;37:138–44.
58. Wilkins JM, Southam L, Mustafa Z, Chapman K, Loughlin J. Association of a functional microsatellite within intron 1 of the BMP5 gene with susceptibility to osteoarthritis. *BMC Med Genet.* 2009;10:141.
59. Rodriguez-Fontenla C, Carr A, Gomez-Reino JJ, Tsezou A, Loughlin J, Gonzalez A. Association of a BMP5 microsatellite with knee osteoarthritis: case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R257.