

---

# **Estudio de Biomarcadores en Artrosis de Rodilla**

---

**Jacobo Formigo Couceiro**

**Ayudas a la investigación 2011**

## **Grupo de Investigación Hospitalario:**

**Jacobo Formigo Couceiro**

Complejo Hospitalario Universitario de Ourense (IP)

## **Grupo de Investigación Universitario:**

**José Luís Capelo Martínez**

Departamento de Química Física,  
Facultad de Ciencias, Campus As Lagoas  
Universidad de Vigo

## MATERIAL Y MÉTODO

### 1. REACTIVOS

Todos los reactivos usados son de grado HPLC o superior. Citrato sódico básico, tripsina, ácido trifluoroacético, albúmina de suero bovino, DL-ditiotreitol (DTT), iodoacetamida (IAA), solución de acrilamida/bis-acrilamida 30% (37.5:1), glicerol 86-88%, Tris-base, azul brillante de Coomassie R250 (CBB), Tetracloroaurato (III) de hidrógeno trihidratado, reactivo de Bradford y el marcador proteico SigmaMarker de rango 6500-200000 Da fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dodecilsulfato sódico (SDS) fue suministrado por Panreac (Barcelona, España).  $\beta$ -mercaptoetanol fue suministrado por Merck (Hohenbrunn, Germany). Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico, bicarbonato amónico (AMBIC) y ácido fórmico fueron suministrados por Fluka (Steinheim, Germany). ZipTipz® fueron suministradas por Millipore. El kit de detección de creatinina en orina procede de Cayman chemicals (Ann Arbor, MI, USA).

### 2. RECEPCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras de suero y orina de pacientes con artrosis de rodilla, con prótesis y del grupo control fueron suministradas cada viernes por el CHUO (Complejo Hospitalario Universitario de Ourense). El cronograma de recogida se detalla en la tabla 1.

Se han procesado todas las muestras de orina disponibles:

- Grupo control: 36.
- Grupo artrosis: 42.
- Grupo prótesis: 57.

**Orina.** 20 ml de orina se centrifugaron 30 min a 8600 g y a continuación diluidos en una relación 1:10 (3 ml hasta 30 ml) con agua milliQ y guardados a -60 °C por quintuplicado. El suero se centrifugó 10 min a 3000 g y el sobrenadante fue guardado a -60 °C en tubos criogénicos por duplicado.

**Sangre.** Las muestras son centrifugadas a 3000g durante 10 min, recogiendo el sobrenadante (suero) en criotubos para su almacenamiento a -80°C. Se toma de cada paciente una alícuota en la que cuantificar el contenido proteico mediante el método de Bradford en un lector de microplacas Labtech® LT-4000.

Tabla 1. Frecuencia de recogida de muestras de pacientes.

	Artrosis	Prótesis	Controles	Total
Mayo	7	13	0	20
Junio	14	26	2	42
Julio	4	10	0	14
Agosto	0	0	0	0
Septiembre	5	8	7	20
Octubre	9	4	16	29
Noviembre	17	1	27	45
Total	56	62	52	170

Después de descartar las muestras de sangre que no han cumplido los criterios clínico - analítico - radiológicos del estudio disponemos de:

- Grupo control: 51.
- Grupo artrosis: 58.
- Grupo prótesis: 58.

### 3. CUANTIFICACIÓN PROTEICA

#### 3.1. Suero

Se diluyen inicialmente 2 microL de suero a una relación 1:500; de esta solución se toma una alícuota y se lleva hasta una relación final 1:2500 en agua milliQ. Se adicionan 50 microL de suero 1:2500, 100 microL de agua milliQ y 150 microL de reactivo de Bradford en un pocillo de una placa. Se realiza una lectura de las absorbancias finales a 595 nm por duplicado.

#### 3.2. Orina

Una fracción de 50 microL de orina recién centrifugada se añade en un pocillo de una placa, se adicionan 100 microL de agua milliQ y 150 microL de reactivo de Bradford. Se realiza una lectura de las absorbancias finales a 595 nm por duplicado.

#### 3.3. Recta de calibrado

Se prepara una recta de calibrado en la que determinar la concentración proteica empleando una solución madre de 100 microg/ml de BSA, a partir de la cual se prepara un rango útil de medida fijando los siguientes puntos: 0 microg/ml, 1 microg/ml, 5 microg/ml, 10 microg/ml, 15 microg/ml, 20 microg/ml y 25 microg/ml. Se toman 150 microL de dichas disoluciones para mezclar con 150 microL de reactivo de Bradford. La lectura de absorbancias se realizó por duplicado a 595 nm.

#### 4. NORMALIZACIÓN RESPECTO A CREATININA DE ORINA

Se realiza una normalización del contenido proteico en las muestras de orina con respecto a la creatinina excretada empleando un kit comercial de Cayman chemicals basado en la determinación colorimétrica empleando el reactivo de Jaffè. Una alícuota de 5 microl de orina recién centrifugada se diluye a una relación final 1:15 en agua milliQ; 150 microl de orina 1:7500 se incuban 10 min con 150 microl de reactivo de Jaffè, determinando la absorbancia inicial a 492 nm, a continuación se adicionan 5 microl de ácido acético y un periodo de incubación de 20 min, calculando la absorbancia final a 492 nm. Los resultados finales de normalización proteica se han expresado en mg proteína/mmol creatinina.

#### 5. APARATOS

La cuantificación proteica de las muestras biológicas fue realizada por el método de Bradford midiendo la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas LT-4000 Labtech. El suministrador de corriente PowerPac Basic de Bio-Rad (CA, USA) fue usado para la separación proteica en SDS-PAGE. Los geles fueron escaneados en un robot ProPicII (Digilab-Genomic Solutions, USA). Los perfiles MS fueron tomados en un aparato Ultraflex II mediante matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight (MALDI-TOF-TOF) (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany), equipado con una celda LIFT y un láser de nitrógeno de 50Hz. El calibrante Peptide Calibration Standard II es también de la casa comercial Bruker.

#### 6. SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS CITRATO-ORO

Las nanopartículas de oro, GNPs, fueron sintetizadas mediante el método de reducción del  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  con citrato sódico en solución acuosa de acuerdo trabajos previamente publicados en nuestro grupo y basado en estudios de uso de GNPs como agentes de extracción proteica en proteómica. 60 ml de una solución (0.075% w/v) de citrato sódico tribásico se calentaron a 100 °C, añadiendo a continuación 54 microl de  $\text{HAuCl}_4$  hidratado (10% w/v). La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante 15 min hasta la aparición de un color rojo intenso. Las nanopartículas sintetizadas se pueden guardar en nevera a 4 °C y ser utilizadas en ensayos por un periodo máximo de un mes.

#### 7. REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN DE PROTEÍNAS

Alícuotas de 10 ml de orina 1:10 fueron diluidas con 20 ml de agua milliQ, ajustando el pH del medio a 8.8 con 1.2 ml de Tris 2.5 M. Los puentes disulfuro se redujeron con 46,2 g de DTT (concentración final de 10 mM) e incubando durante 1 h a 37 °C. A continuación se procedió a la alquilación con 277.5 mg de IAA (concentración final de 50 mM), incubando durante 45 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.

#### 8. FRACCIONAMIENTO PROTEICO CON CITRATO-GNPS

Posteriormente a los pasos de reducción y alquilación, 1000 microl de GNPs se añadieron a las muestras, seguidos de 1400 microl de ácido cítrico 1M para fijar el pH a 4.0. A continuación, la solución de muestra con GNPs se incubó a 37 °C en un baño termostatzado durante 2 h. Se recolectó un pellet tras centrifugación a 8600 g durante 40 min, lavándose con 1000 microl de un tampón ácido cítrico/citrato a pH=4.0. Este pellet se reconstituyó en 10 microl de ACN 50% en AMBIC 25 mM, una alícuota de 5 microl se sometió a digestión proteica en 50 microl tamponados con AMBIC 25 mM y el consiguiente análisis por MALDI-TOF MS.

#### 9. DIGESTIÓN PROTÉICA

Posteriormente a la reducción, alquilación y fraccionamiento proteico utilizando GNPs, se obtuvo un pellet. Éste fue estudiado mediante un protocolo de digestión proteica ultra-acelerado ya desarrollado en nuestro laboratorio. 10 microl de tripsina preparada en 0.001% TFA se añadieron al pellet resuspendido en una relación 1:20, de acuerdo las recomendaciones del fabricante. La digestión acelerada se realizó en un ultrasonic cup-horn Sonoplus (Bandelin electronic, Berlin, Germany) trabajando a 50% amplitud durante 2.5+2.5 min. A continuación, la actividad trípica fue detenida con la adición de 1 microl de ácido fórmico 50%. Las muestras se desalaron de acuerdo el protocolo empleado por Santos et al. como se resume: (i) Paso de activación: aspirar y dispensar (AyD) 1x25 microl ACN, AyD 1x25 microl 50% ACN + 0.1% TFA y AyD 2x25 microl 0.1% TFA; (ii) Paso captura de péptidos: AyD la muestra 20 ciclos ajustando la pipeta a 25 microl (iii) Paso de lavado: AyD 3x25 microl 0.1% TFA y, finalmente, (iv) Paso de elución de péptidos: AyD 20x10 microl 90% ACN + 0.1% TFA. La solución fue entonces completamente secada en una centrifuga de vacío UNIVAPO 150 ECH de UniEquip (Martinsried, Germany) acoplada con una bomba de aspiración refrigerada modelo Unijet II (UniEquip) y resuspendido en 10 microl de  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA). 0.5 microl de esta solución se espotó en una placa MALDI mezclada con 1 microl  $\alpha$ -CHCA (10 mg/ml preparado en 50% v/v ACN / 0.1% v/v TFA).

#### 10. ANÁLISIS DEL DIGERIDO PROTEICO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI

El espectrómetro de masas opera en modo positivo usando un reflectrón, los espectros se han adquirido en el rango de m/z desde 600 a 3500. Un total de 500 espectros se han adquirido por cada muestra a una frecuencia de láser de 50 Hz. Se empleó una calibración externa con los picos monoisotópicos  $[M+H]^+$  de bradikina 1-7 (m/z 757.3992), angiotensina II (m/z 1046.5418), angiotensina I (m/z 1296.6848) substancia P (m/z 1758.9326), ACTH clip 1-17 (m/z 2093.0862), ACTH 18-39 (m/z 2465.1983) y somatostatina 28 (m/z 3147.4710).

## 11. SDS-PAGE

Volúmenes de 5 microl de (i) Marcador de pesos moleculares de amplio rango SigmaMarker 6.500-200.000 Da y, o (ii) solución de orina o (iii) pellets de orina se mezclaron con 5 microl de tampón de carga 4x (5ml of Tris-Base 0.5 M, 8ml of SDS at 10% w/v, 1ml of  $\beta$ -mercaptoethanol, 2 ml of glycerol, and 4 mg of bromophenol-blue, diluyendo en 20 ml de agua). A continuación, se cargaron las muestras en una matriz de gel de 1 mm de grosor y composición 4% gel concentrador/ 12.5% gel separador, realizando la electroforesis a 150 V durante 60 min. A la finalización, los geles se lavaron con agua milliQ y se tñeron en una solución de Coomassie R-250 a temperatura ambiente (preparado previamente por disolución de 1 g de Coomassie-blue en 200 ml de una mezcla 45% metanol y 7,5% ácido acético glacial). Tras tinción, el gel se lavó con agua milliQ y con una solución de destinción durante 3 h (45% metanol, 7,5% ácido acético glacial). Las imágenes de los geles se tomaron en un robot ProPicII (Digilab Genomic Solutions, EUA).

## 12. DEPLECIÓN PROTEICA EN SUERO

La depleción proteica mediante el uso de ACN conduce a la formación de un precipitado constituido preferentemente por aquellas proteínas de MW>75 KDa, además de reducir la concentración de aquellas proteínas más abundantes. El uso de DTT, en cambio, precipita aquellas proteínas enriquecidas en residuos sulfurados. Se ha seguido un protocolo de depleción secuencial basado en los estudios publicados por Fernandez-Costa et al. Se descongela una alícuota de 100 microl de suero y se divide en 12 fracciones de 20 microl y 1000 microg de proteína cuantificada mediante Bradford; se trata cada fracción con 2,2 microl DTT 500mM, dejando incubar durante una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se observa la formación de una turbidez y se separan ambas fases mediante centrifugación a 14000 g durante 20 min. Se trasvasa el sobrenadante a un nuevo eppendorf y se lleva a un volumen final de 20 microl; se adicionan 44,5 microl más de H<sub>2</sub>O milli-Q y 85,5 microl de ACN enfriado. La solución se deja incubar en baño de ultrasonidos durante 10 min para, a continuación, separar ambas fases mediante una nueva centrifugación a 14000 g durante 10 min. Se mezclan los sobrenadantes de 4 fracciones antes de llevar a sequedad a vacío. El pellet resultante es disuelto en 50 microl de Lysis Buffer para su cuantificación mediante Bradford y posterior carga en tiras de IEF.

## 13. 2D-GE

100 microg de proteína correspondientes al sobrenadante resultante de la depleción DTT/ACN son cargados mediante método de cup loading en una tira IEF con rango de pH 4-7, y 10 KV·h a un tiempo final de 5 h.

Finalizada la primera dimensión, se equilibró la strip en una solución de DTT/SDS-Equilibration buffer durante 15

min y, posteriormente, en una solución de IAA/SDS-Equilibration buffer por otros 15 min. La tira es así acoplada a la segunda dimensión en un gel de acrilamida al 12.5% y sellado con agarosa. Se aplicó un voltaje de 200 V durante 60 min hasta llegar al final de recorrido.

Los geles obtenidos fueron teñidos con Coomassie coloidal y almacenados en una solución 0.5M NaCl hasta su posterior utilización.

Se obtuvieron imágenes digitalizadas con los siguientes tiempos de exposición: 10 ms, 15 ms, 18 ms.

# DISCUSIÓN Y RESULTADOS

## 1. CREACIÓN DE UN BANCO DE ORINA

El diseño de un biobanco es un paso tan crítico como esencial si queremos garantizar el éxito de la investigación proteómica a realizar. El diseño de un biobanco debe contemplar aspectos éticos y morales, garantizar el anonimato de los donantes, así como suponer una logística lo más sencilla posible que minimice la introducción de mayores variabilidades que las inherentes a las propias muestras almacenadas. Es condición ineludible el garantizar que el método de almacenamiento escogido para una muestra biológica será compatible con los métodos analíticos que se van a realizar posteriormente. Y no es menos importante poder asegurar la estabilidad del proteoma a lo largo de toda la vida útil de la muestra, manteniéndose lo más inalterado posible el contenido proteico a lo largo del tiempo.

En lo que respecta a las muestras de suero y plasma, diversos trabajos han sido publicados con la finalidad de estandarizar en lo posible los diferentes biobancos. La HUPO ha establecido una serie de recomendaciones a seguir en el caso de estas muestras biológicas. Las características físicoquímicas y, especialmente las microbiológicas, de la orina han hecho de este fluido biológico uno de los más difíciles de almacenar a medio plazo debido a la degradación proteómica debida a estos factores. Esta dificultad de almacenamiento debe sumarse a la gran variabilidad biológica que posee en su composición, incluso dentro de un mismo individuo. A pesar de estas grandes desventajas, las muestras de orina son cada vez más empleadas por ser un fluido de muy sencilla obtención y que puede proporcionar una información primaria no solamente a nivel analítico, también de monitorización farmacológica, proteómica e incluso citológica. No es de extrañar que la HKUPP haya realizado un esfuerzo considerable en la búsqueda de estandarización del almacenamiento de muestras de orina.

Se ha realizado un trabajo previo encaminado a la evaluación de la conveniencia de adoptar el método recomendado por la HKUPP en la elaboración de un biobanco de muestras de orina de pacientes adultos diagnosticados



## 2. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE PROFILING DEL URINOMA CON GNPs.

En la implementación de la captura proteica con GNPs en muestras de suero publicado por Lopez-Cortes et al. se demostró la importancia crítica de los factores (i) ratio GNPs/ proteína, (ii) rango de pH y (iii) tiempo de incubación. La adaptación del protocolo de trabajo en orina requiere la valoración de los mismos factores en el proceso de optimización de la captura proteica.

### 2.1. Ratio GNPs/proteína

En el caso de tratar muestras de suero la relación óptima GNPs/proteína se fijó en 5; la extrapolación lineal de este ratio para la orina supondría el uso de 150 ml de GNPs, factor totalmente inasumible. Wang et al. emplearon un volumen de 600 microl en el tratamiento de muestras de orina diluidas. En nuestro caso la cantidad final fue fijada en 1 ml de GNPs habida cuenta de que la centrifuga solamente alcanza las 8600g máximas, en lugar de las recomendadas por el autor, y es necesario obtener un pellet de un tamaño tal que sea manejable posteriormente. Incluso 8600g son insuficientes para recoger completamente todas las GNPs, pero se realizó un estudio por sextuplicado con el que poder garantizar que el proceso de incubación-centrifugación de la muestra era lo suficientemente reproducible. Debido a la gran variabilidad observada en la concentración proteica de las muestras de orinas del biobanco fue necesario plantear una normalización respecto al volumen de acuerdo con las recomendaciones de Terracciano et al. , fijando este volumen en 30 ml finales.

En la figura 2B se recoge la captura proteica de una alícuota de 3 ml de orina con un contenido proteico de 41.2 µg/ml llevada a un volumen final de 30 ml. 6 alícuotas fueron reducidas, alquiladas e incubadas durante 2 horas a 37°C con 1 ml de GNPs a pH=4.0. Se recogió un pellet tras centrifugación a 8600g durante 40 minutos que fue resuspendido en 10 µl de ACN 50% (AMBIC 25mM), cargando 5 µl en gel. La comparación entre las 6 bandas no permite distinguir ausencia alguna de spots de proteínas entre sí, lo que se comprobó gráficamente mediante el trazado de los correspondientes bandagramas (vid. imago infra) en ProPic II.

Se realizó la digestión ultrarrápida de la restante alícuota de 5 µl suspendida en un volumen final de 50 µl de AMBIC 25mM (5% ACN) y 2x2.5min de sonicación al 50% de amplitud. La digestión se detuvo con la adición de 1 µl de FA 50%, se pasó la muestra a través de una ZipTip® y se espotó por quintuplicado en una placa de MALDI MS para analizar la similitud entre todas las réplicas estudiadas, con un resultado final de 0.550±0.047.

Paralelamente se estudiaron dos series con un contenido proteico que eran un tercio y el triple del descrito, 41.2 µg y 370.8 µg de proteína, respectivamente, todos ellos normalizados en volumen. En la figura 2A y 2D se

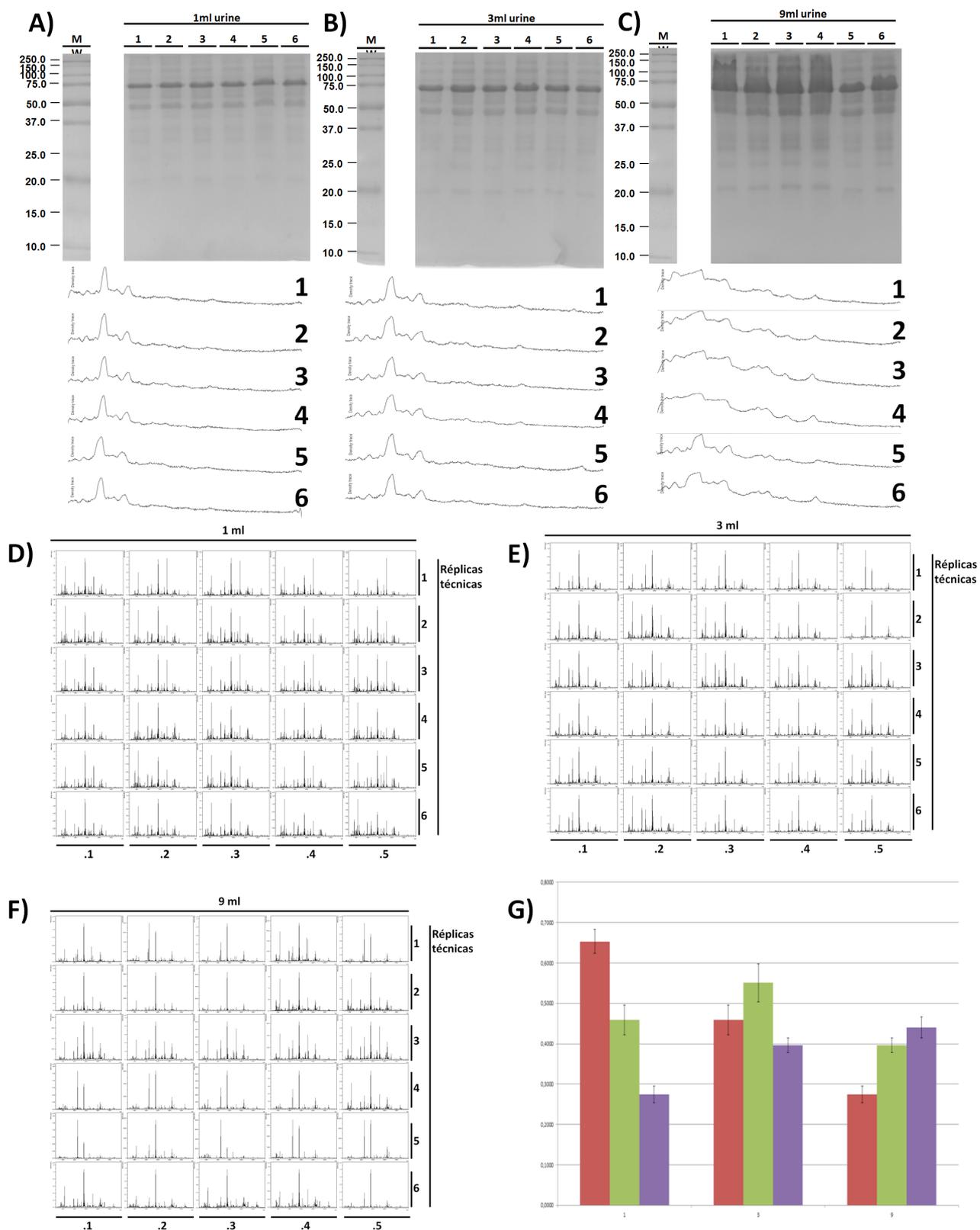
refieren los resultados de 1D-GE y MALDI MS, respectivamente, obtenidos para la muestra más diluida, observando una reproducibilidad un 18.2±0.3% mayor con respecto a las estudiadas para 3 ml de orina. Asimismo existe una similitud del 0.459±0.037 entre ambos grupos. En lo que respecta a la tanda más concentrada, es la que menos reproducibilidad mostró entre sus réplicas de acuerdo a su bandagrama representado en la figura 2C, presumiblemente debido a un fenómeno de arrastre inespecífico durante el proceso de captura proteica por parte de las GNPs ya observado varias veces. La peor similitud con respecto a los otros dos grupos obtenida mediante el análisis estadístico de los espectros de MALDI MS (0.275±0.021 con la serie de menor contenido proteico y de 0.396±0.018 con la intermedia) sugieren fijar el límite a analizar en los 125 µg de proteína.

### 2.2. Rango de pH y tiempo de incubación

En el proceso de captura mediante GNPs intervienen dos factores principales, (i) los residuos sulfurados de Cys, Met y otros aminotioles y (ii) la atracción electroestática entre péptidos y proteínas con carga positiva y las nanopartículas cuyo potencial ζ (zeta) es negativo. Con la finalidad de fijar el pH que favoreciera la captura proteica en nuestras muestras de orina se realizó una serie de incubaciones en un rango desde 3.5 a 9.5. Un pH más ácido conduce a la precipitación de las GNPs y pHs>8 no resultan efectivos debido a la presencia de una repulsión electroestática entre la mayor parte de las proteínas y la superficie de la nanopartícula .

Adicionalmente al rango de pH se estudió el tiempo de incubación más adecuado; para ello se valoró si dejar la solución durante 2 horas a 37 °C (2) o si dejar reposar a temperatura ambiente y en agitación durante toda la noche la mezcla tras este periodo de incubación para favorecer la formación de los agregados GNPs-proteína (2+0). En la figura 3A y 3B se observa claramente la diferencia que existe entre ambas estrategias, invariablemente, dejar en reposo las soluciones a extraer conduce a una menor captura proteica, lo que se deduce de la menor intensidad de todas las bandas 2+0 comparadas con las respectivas intensidades de aquellas que fueron centrifugadas y concentrado sus pellets inmediatamente después de finalizar la incubación. Los espectros MALDI avalan esta idea, para todo el rango de pH estudiado, entre el binomio 2h y 2h+0 los segundos son mucho más pobres en señales comparados con los equivalentes al proceso de centrifugar inmediatamente después de finalizar la incubación a 37°C.

En cuanto al rango de pH, se observa el mayor número de spots y de mayor intensidad en el rango comprendido entre un pH 3.5 y 4.5; resultado que está en la línea de nuestros estudios previos realizados en suero, así como de otras investigaciones similares llevadas a cabo por otros grupos de investigación en muestras de orina. A niveles superiores de pH la captura proteica decrece

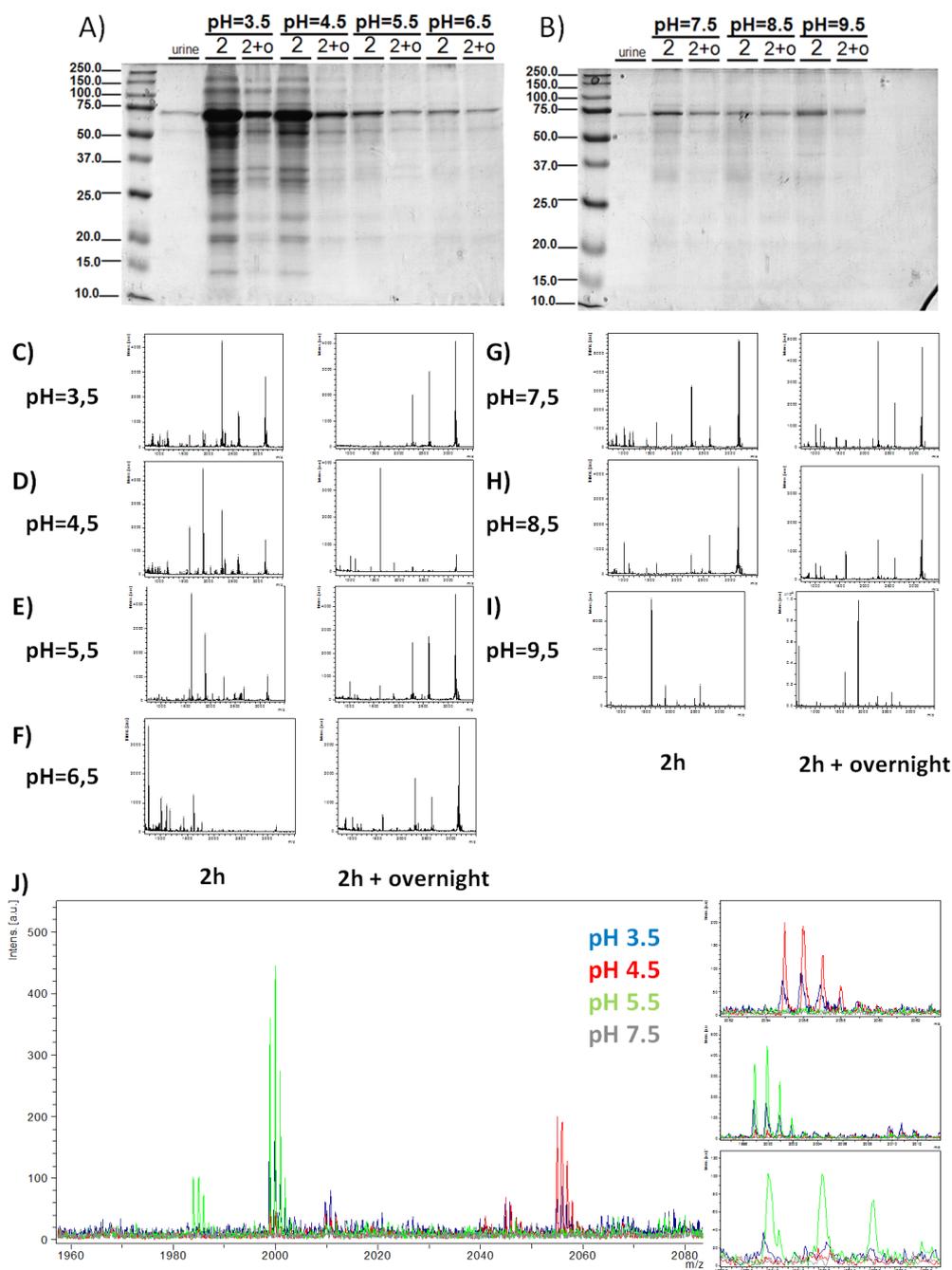


**Figura 2.** Reproducibilidad de incubación durante 2 horas a 37°C a pH=4.0 con 1 ml de GNPs. (A) De 1 ml de orina 41.2  $\mu\text{g/ml}$  ajustado a 30 ml finales, 41.2  $\mu\text{g}$ . (B) De 3 ml de orina 41.2  $\mu\text{g/ml}$  ajustado a 30 ml finales, 123.6  $\mu\text{g}$ . (C) De 9 ml de orina 41.2  $\mu\text{g/ml}$  ajustado a 30 ml finales, 370.8  $\mu\text{g}$ . Una alícuota de 5  $\mu\text{l}$  de cada banda fue reservada para un estudio de la reproducibilidad mediante MALDI MS, cada una fue espoteada 5 veces en placa. (D) Procedente de muestra de 1 ml de orina 41.2  $\mu\text{g/ml}$  ajustado a 30 ml finales, 41.2  $\mu\text{g}$ . (E) Procedente de muestra de 3 ml de orina 41.2  $\mu\text{g/ml}$  ajustado a 30 ml finales, 123.6  $\mu\text{g}$ . (F) Procedente de muestra de 9 ml de orina 41.2  $\mu\text{g/ml}$  ajustado a 30 ml finales, 370.8  $\mu\text{g}$ . (G) Similitud entre los tres grupos analizados, el rojo corresponde a 1 ml de orina normalizado, el verde a 3 ml y el violeta a 9 ml. Los resultados se han representado agrupados en una triada, donde la primera columna se refiere a las similitudes con respecto a 1 ml de orina normalizado, la segunda a 3 ml y la tercera las similitudes con los 9 ml normalizados. 1\_1  $0.653\pm 0.030$ ; 1\_3  $0.459\pm 0.037$ ; 1\_9  $0.275\pm 0.021$ ; 3\_3  $0.550\pm 0.047$ ; 3\_9  $0.396\pm 0.018$ ; 9\_9  $0.440\pm 0.026$ .

significativamente, estabilizándose en una meseta que se mantuvo hasta el valor más básico analizado. Los espectros de MALDI MS son todavía más significativos, mientras que a pHs 3.5 y 4.5 se obtienen espectros de perfiles peptídicos relativamente ricos en señales, a un pH 5.5 tanto la intensidad de los picos como su número es mucho menor; a pH 7.5 solamente pudieron detectar-

se los tres picos más intensos, es un espectro a todas luces insuficiente para obtener un perfil peptídico de interés.

En base a los resultados de tiempo y acidez del medio, fijamos las condiciones de incubación en 2 horas y a pH=4.0.

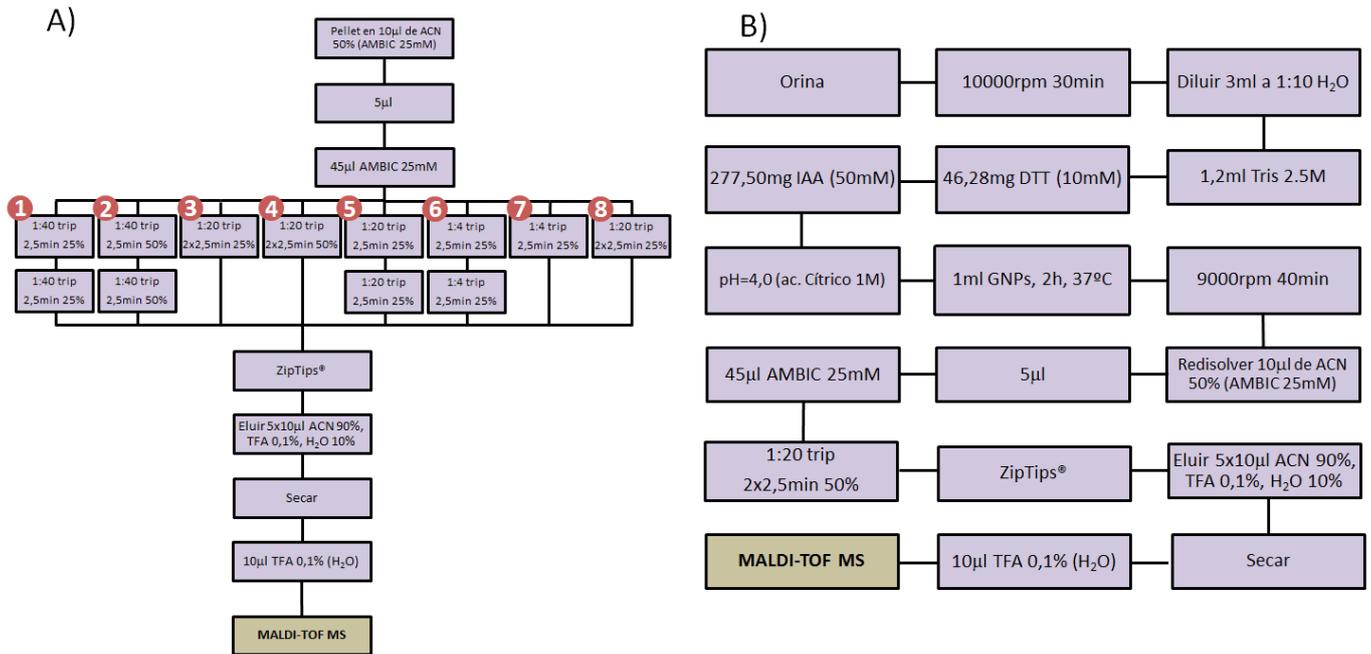


**Figura 3.** (A) Rango ácido de incubación de 30 ml de orina 1:30, la banda 2 se refiere a 2 horas de incubación a 37°C mientras que 2+o supone la adición de un paso de reposo posterior a la incubación para favorecer la estabilización teórica de los agregados GNPs-proteína. (B) Rango básico de incubación de 30 ml de orina 1:30, la banda 2 se refiere a 2 horas de incubación a 37°C mientras que 2+o supone la adición de un paso de reposo posterior a la incubación para favorecer la estabilización teórica de los agregados GNPs-proteína. (C) Espectro MALDI MS de alícuota de orina 1:30 incubada a pH=3.5. (D) Espectro MALDI MS de alícuota de orina 1:30 incubada a pH=4.5. (E) Espectro MALDI MS de alícuota de orina 1:30 incubada a pH=5.5. (F) Espectro MALDI MS de alícuota de orina 1:30 incubada a pH=6.5. (G) Espectro MALDI MS de alícuota de orina 1:30 incubada a pH=7.5. (H) Espectro MALDI MS de alícuota de orina 1:30 incubada a pH=8.5. (I) Espectro MALDI MS de alícuota de orina 1:30 incubada a pH=9.5. (J) Detalle de superposición de los espectros representados en (C), (D), (E) y (G) entre 1960-2080 m/z.

### 2.3. Digestión triptica

El uso de 1 ml de GNPs como agentes de captura de proteínas en la muestras de orina y su posterior concentración en un volumen final de 10  $\mu$ l de ACN 50% (AMBIC 25mM) dificulta sobremanera el correcto éxito de la digestión triptica mediante ultrasonidos. En primer lugar se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l de la solución final concentrada y se diluyó en 45  $\mu$ l de AMBIC 25mM para garantizar un medio de pH>7, [ACN]=5% y se diluyen

los agregados de GNPs en el que la tripsina puede ejercer su actividad de corte. Se ensayaron 8 variantes de digestión, todas ellas basadas en el protocolo de digestión ultrarrápida desarrollado por el grupo de investigación y que se encuentran recogidas en el esquema 1A. En vista a los espectros obtenidos se aplicó el método 4, coincidente con los parámetros clásicos utilizados de manera rutinaria.



**Figura 4.** (A) Ensayos conducentes a la fijación del tratamiento de digestión ultrarrápida en sonda de ultrasonidos; el pellet de GNPs se diluyó en 50 microl de ACN 50%, en una alícuota de 5 microl se ajustó el pH al adecuado para la acción de la tripsina y se probaron las siguientes condiciones de digestión. (A1) 2 adiciones en relación proteica 1:40, 2x2.5 min, 25% de amplitud; (A2) 2 adiciones en relación proteica 1:40, 2x2.5 min, 50% de amplitud; (A3) 1 adición en relación proteica 1:20, 2x2.5 min, 25% de amplitud; (A4) 1 adición en relación proteica 1:20, 2x2.5 min, 50% de amplitud; (A5) 2 adiciones en relación proteica 1:20, 2x2.5 min, 25% de amplitud; (A6) 2 adiciones en relación proteica 1:4, 2x2.5 min, 25% de amplitud; (A7) 1 adición en relación proteica 1:4, 2x2.5 min, 25% de amplitud; (A8) 1 adición en relación proteica 1:20, 2x2.5 min, 25% de amplitud. Los péptidos obtenidos se preconcentraron con ziptips como paso previo al correspondiente análisis por MALDI MS. (B) Protocolo de tratamiento de muestras de orina para la obtención del perfil peptídico; brevemente, a la recepción de la muestra ésta fue centrifugada para eliminar posibles restos celulares presentes, el almacenamiento se realizó a -60°C en una dilución 1:10. Los tubos Falcon de los pacientes a estudiar se descongelaron, se ajustó el medio con tampón Tris-HCl 2.5 M y la proteínas presente se redujo y alquiló con DTT 10 mM e IAA 50 mM, respectivamente, según técnica de proteómica clásica, se ajustó el pH=4.0 con ácido cítrico 1 M previamente a la incubación con 1 ml de GNPs durante 2 h a 37°C, se recolectó el pellet de nanopartículas mediante centrifugación y se resuspendió en ACN 50%, una alícuota de 5 microl de esta solución se basificó con AMBIC 25 mM previamente a la adición de tripsina. Los péptidos obtenidos se preconcentraron en ziptips para su carga en la placa de MALDI MS y consecuente análisis.

### 3. ANÁLISIS DE MUESTRAS CLÍNICAS

Se analizaron un total de 137 pacientes, de los que 42 son pacientes de artrosis, 59 han sido intervenidos con una prótesis y 36 son controles negativos para la enfermedad a estudiar. Tras descartar las que no cumplían los criterios de inclusión se incluyeron 134 muestras, 42 de pacientes con artrosis, 35 de controles y 57 de prótesis. Las medias de edad de los grupos a evaluados fueron de 67, 65 y 69 años, respectivamente. Un 80% de los pacientes con artrosis y un 72% de las protetizadas

son de sexo femenino, mientras que en el caso de los controles suponen el 46% de los individuos analizados.

En cuanto a la identificación de potenciales biomarcadores séricos se prepararon 3, 2 y 2 pools de pacientes control, de prótesis y sanos respectivamente, cada uno de ellos compuesto por una combinación de 25 pacientes y de edades medias de 66, 65, 65; porcentajes de mujeres del 48%, 52% y 80% para el caso de los grupos control. De edades 69,6 y 69,2 y un porcen-

taje de mujeres del 71% para el caso de implantados de prótesis y, finalmente de edad media de 66,6 y 66,2 con porcentajes del 84% y del 80% para el caso de los diagnosticados de artrosis (ver anexo I). La ventaja del uso de pools sobre un estudio individualizado está en que aquellas variaciones discretas y propias de la fisiología de un paciente se ven minimizadas dentro del pool, mientras que aquellas alteraciones en el proteoma por causa la artrosis tendrán un comportamiento sinérgico y pueden conducir a la identificación de potenciales biomarcadores con mayor utilidad en un amplio espectro de pacientes.

### 3.1. Profiling de orina

#### 3.1.1. Diagnóstico automático

Uno de los campos más importantes de la inteligencia artificial es el aprendizaje automático. Los trabajos en este campo se centran en la creación de algoritmos capaces de reconocer y aprender los patrones presentes en un conjunto de datos asociados a determinadas condiciones, en un proceso que se denomina “entrenamiento”. Tras el entrenamiento de un algoritmo se espera que, al serle presentada una nueva instancia con las mismas características que las que se han empleado durante su entrenamiento, este sea capaz de identificar con qué condición está asociada dicha instancia.

Como parte de esta investigación, se ha realizado un estudio sobre la posibilidad de identificar de forma automatizada la condición asociada a una muestra analizada mediante espectrometría de masas utilizando MALDI-TOF. Para ello, se ha evaluado la aplicabilidad de distintas técnicas de aprendizaje automático, adecuadas para este tipo de trabajo.

#### 3.1.2. Conjunto de datos

En la realización de esta parte del estudio se ha utilizado un conjunto de datos compuesto por pacientes con tres condiciones distintas: i) prótesis, ii) artrosis y iii) control, es decir, pacientes que no presentan ninguna de las dos condiciones anteriores. En total se han estudiado 136 pacientes, distribuidos como se indica en la *Tabla 3* entre las distintas condiciones.

**Tabla 3.** Distribución de pacientes entre las distintas condiciones.

Condición	Nº de Pacientes
Prótesis	58
Artrosis	42
Control	36
Total	136

Con el fin de reducir el ruido técnico, las muestras de cada paciente han sido analizadas por quintuplicado en el MALDI-TOF, generando de este modo, cinco espectros para cada paciente.

#### 3.1.3. Procesado de datos.

Los datos de los espectros obtenidos a partir de las muestras deben ser preprocesados para, por un lado, eliminar el ruido presente y, por otro lado, obtener un único espectro representativo de cada muestra que resume los cinco espectros generados durante su análisis.

Tras realizar un estudio de los parámetros ideales para llevar a cabo este proceso, se ha determinado que la mejor configuración en este caso, y por tanto la empleada, es eliminar aquellos picos con un ratio de señal/ruido (SN) inferior a 6, permitir un margen de error de 300 ppm en el alineamiento de picos y seleccionar únicamente aquellos picos que aparecen en, al menos, cuatro de las cinco réplicas realizadas para cada muestra. Como parte final del preprocesado, el conjunto de datos ha sido discretizado, sustituyendo la intensidad de los picos detectados por un valor booleano indicando su presencia o ausencia.

#### 3.1.4. Evaluación de técnicas de aprendizaje automático.

El conjunto de los datos de todos los pacientes, una vez preprocesados, se ha empleado como base para la evaluación de la aplicabilidad de distintas técnicas de aprendizaje automático. El esquema elegido para evaluar los algoritmos de clasificación ha sido una *Leave-One-Out Cross Validation*, un proceso iterativo en el cual se realizan tantas evaluaciones como muestras hay en el conjunto de datos. En cada evaluación el clasificador se entrena con todas las muestras menos una, que será la que el algoritmo deberá clasificar. La muestra a clasificar nunca se repetirá, con lo que al final de la evaluación todas las muestras habrán sido clasificadas por el algoritmo. Este es un método exhaustivo que permite evaluar el comportamiento real del clasificador de una forma bastante realista.

En total se han evaluado diez algoritmos distintos, aunque algunos de ellos pertenecen a la misma familia de clasificadores. Todos ellos han sido tomados de la biblioteca Weka (<http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/>) y, salvo en aquellos casos en los que se indica explícitamente, se han utilizado los parámetros por defecto. Además, cada clasificador ha sido combinado con una selección de características basada en el test de  $\chi^2$ , mediante la cual se han seleccionado las 20 mejores características (esto es, los 20 mejores picos).

Dado que la distinción entre los pacientes de prótesis y los pacientes con artrosis puede resultar complicada desde el punto de vista proteómico, la evaluación de algoritmos de aprendizaje automático se llevó a cabo tanto para identificar los sujetos de las tres condiciones por separado (problema triclase), como para distinguir los controles frente a los que sufren artrosis o portan ya prótesis (problema biclase). Este último resulta un problema de clasificación más sencillo, por lo que cabe esperar mejores resultados.

A continuación se presentan los resultados tanto para el problema triclase, como para el problema biclase. Para cada una de las clases se muestra la sensibilidad (Sen.), especificidad (Esp.) y el cociente de correlación de Matthews (MCC, *Mathews Correlation Coeficient*) obtenidos por cada algoritmo.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la evaluación de los clasificadores utilizando un conjunto de datos

triclase. En este caso, el clasificador IBk se ha configurado para optimizar en valor de k hasta un máximo de 10, y el coeficiente del clasificador C4.5 se ha establecido en 0.15. En este caso, cabe destacar el resultado obtenido por el clasificador C4.5, obteniendo un valor de MCC de 0,766 para la clase control y manteniéndose por encima de 0,4 para el resto de las clases. Aún así, los resultados obtenidos por los clasificadores indican que aún existe un amplio margen de mejora.

**Tabla 4.** Resumen de los resultados de la evaluación de los clasificadores utilizando un conjunto de datos triclase.

	Prótesis			Artrosis			Control		
	Sen.	Esp.	MCC	Sen.	Esp.	MCC	Sen.	Esp.	MCC
Bayes Net (BN)	0,621	0,615	0,234	0,333	0,830	0,182	0,639	0,830	0,454
Decision Table (DT)	0,655	0,590	0,242	0,595	0,766	0,351	0,389	0,950	0,431
IB-10 (IB10)	0,621	0,590	0,208	0,452	0,734	0,184	0,417	0,910	0,378
<b>C4.5 (J48)</b>	<b>0,672</b>	<b>0,731</b>	<b>0,402</b>	<b>0,690</b>	<b>0,819</b>	<b>0,498</b>	<b>0,750</b>	<b>0,970</b>	<b>0,766</b>
Naïve Bayes (NB)	0,621	0,615	0,234	0,333	0,830	0,182	0,639	0,830	0,454
Naïve Bayes Simple (NBS)	0,621	0,615	0,234	0,333	0,830	0,182	0,639	0,830	0,454
Random Forest (RF)	0,362	0,590	-0,049	0,405	0,713	0,116	0,583	0,820	0,393
SMO (SMO)	0,638	0,667	0,302	0,643	0,809	0,443	0,667	0,960	0,684
SVM Lineal Kernel (SVM-L)	0,724	0,487	0,214	0,381	0,809	0,202	0,444	0,960	0,504
SVM RBF Kernel (SVM-R)	0,638	0,641	0,276	0,571	0,819	0,393	0,667	0,940	0,645
Bayes Net (BN)	0,621	0,615	0,234	0,333	0,830	0,182	0,639	0,830	0,454

En la Tabla 5 se presentan los resultados de la evaluación de los clasificadores utilizando un conjunto de datos biclase. Como en el caso anterior, el clasificador IBk se ha configurado para optimizar en valor de k hasta un máximo de 10, aunque, en este caso, el coeficiente del clasificador C4.5 se ha reducido hasta 0.05. Los resultados obtenidos por los clasificadores en este caso son notablemente mejores, destacando, de nuevo, los obte-

nidos por el clasificador C4.5, cuyo índice MCC se mantiene en 0,786 en ambas clases. Además, es notable la sensibilidad obtenida por los clasificadores en general respecto a los casos, indicando la baja probabilidad de no identificar un paciente con una patología como tal. Por otro lado, la especificidad de los casos resulta ligeramente baja.

**Tabla 5.** Resumen de los resultados de la evaluación de los clasificadores utilizando un conjunto de datos biclase.

	Casos			Controles		
	Sen.	Esp.	MCC	Sen.	Esp.	MCC
Bayes Net (BN)	0,840	0,639	0,467	0,639	0,840	0,467
Decision Table (DT)	0,980	0,583	0,663	0,583	0,980	0,663
IB-10 (IB10)	0,950	0,556	0,576	0,556	0,950	0,576
<b>C4.5 (J48)</b>	<b>0,980</b>	<b>0,750</b>	<b>0,786</b>	<b>0,750</b>	<b>0,980</b>	<b>0,786</b>
Naïve Bayes (NB)	0,840	0,639	0,467	0,639	0,840	0,467
Naïve Bayes Simple (NBS)	0,840	0,639	0,467	0,639	0,840	0,467
Random Forest (RF)	0,970	0,694	0,725	0,694	0,970	0,725
SMO (SMO)	0,980	0,667	0,726	0,667	0,980	0,726
SVM Lineal Kernel (SVM-L)	0,980	0,667	0,726	0,667	0,980	0,726
SVM RBF Kernel (SVM-R)	0,990	0,417	0,557	0,417	0,990	0,557
Bayes Net (BN)	0,840	0,639	0,467	0,639	0,840	0,467

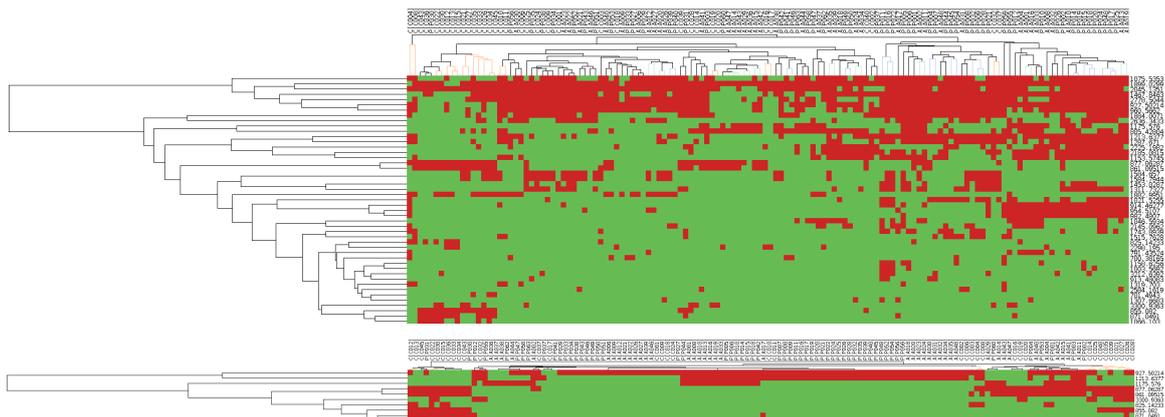
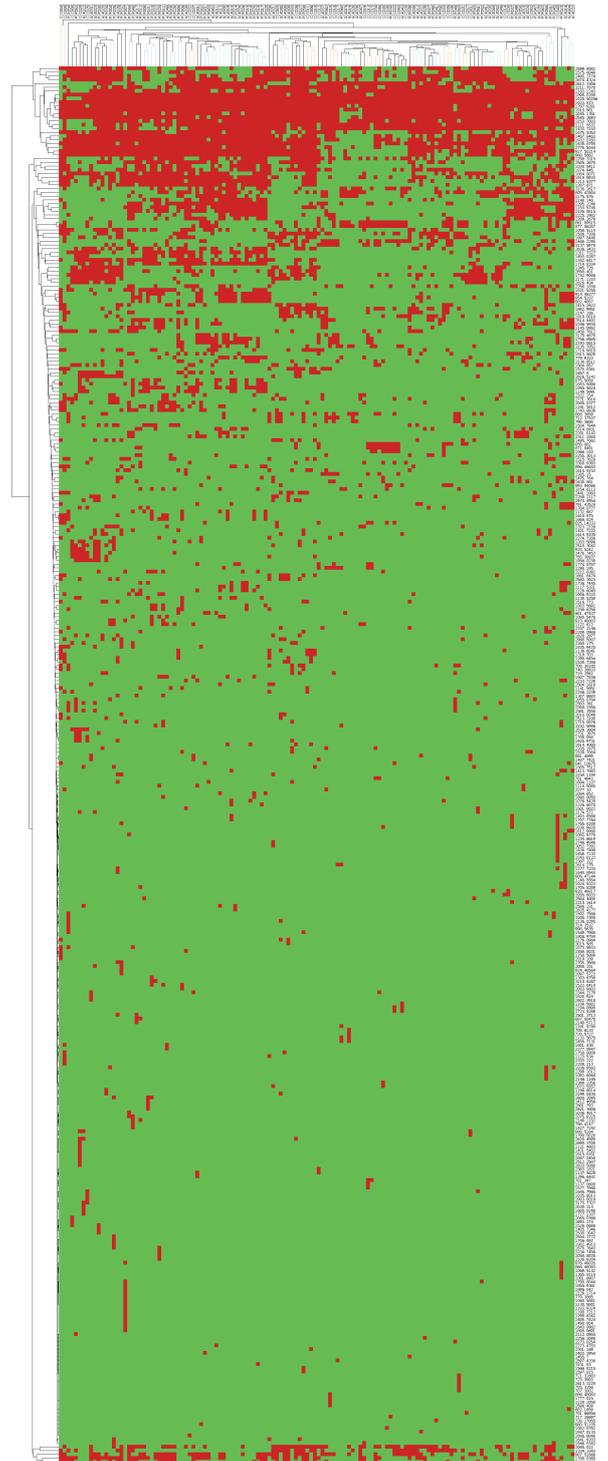
### 3.1.5. Identificación de picos discriminantes.

La identificación de picos asociados a una condición determinada resulta interesante para el diagnóstico automático, puesto que su presencia o ausencia puede ser indicadora de la condición asociada. Este tipo de picos se denominan “biomarcadores” puesto que son elementos biológicos que “marcan” la presencia de una condición determinada, en ciertos casos, una patología.

Como complemento a la evaluación de algoritmos de aprendizaje automático, se ha realizado un análisis basado en tests estadísticos con el fin de identificar picos que puedan resultar discriminantes entre dos o más condiciones. En el documento “peaklists.xlsx” que se adjunta se presentan dos tablas con la lista de picos identificados, tanto para el problema biclase, como para el problema triclase. Con el fin de identificar el poder discriminante de cada pico, se ha aplicado un test estadístico adecuado (test de Fisher para biclase y test  $\chi^2$  para triclase) y, con el fin de evitar falsos positivos entre los posibles picos discriminantes, el resultado de los tests estadísticos ha sido corregido mediante la corrección FDR de Benjamini-Hochberg.

El resultado ha sido la identificación de 9 picos discriminantes en ambos casos, presentando todos ellos un q-valor  $< 0,05$ , lo que indica un comportamiento significativamente distinto en dos o más clases. Tras revisar el valor de los picos identificados, se puede observar como la coincidencia de las dos listas de picos casi total, diferenciándose ambas únicamente en dos picos. Esto indica que los picos discriminantes identificados permiten, principalmente, distinguir la clase control del resto de clases, apuntando hacia una carencia de picos discriminantes entre las condiciones prótesis y artrosis. De este modo, se confirma lo visto en los resultados de la evaluación de clasificadores, donde los valores de los estadísticos para estas dos condiciones resultaron inferiores a los obtenidos para la condición control.

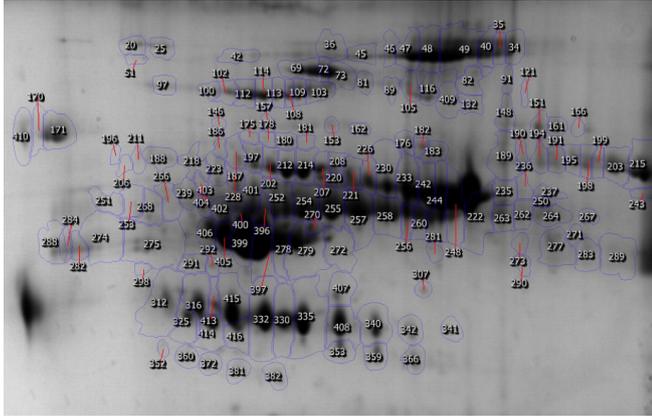
**Figura 5.** Los rangos de valores de los parámetros de preprocesado utilizados fueron: Peak Intensity (Intensidad mínima): 0.0-0.2 con un paso de 0.05 (es decir, 0.0, 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2). Signal/Noise: 3-10 con un paso de 1. PPM: 100-300 con un paso de 50. POP: 0.6-1 con un paso de 0.2.



### 3.2. Identificación de biomarcadores en suero.

Tras la obtención de geles 2D (Figura 6A). Se han obtenido 35 spots con características diferenciales  $p < 0,05$  entre los tres grupos y 17 spots con características diferenciales  $p < 0,01$  (Figura 6B).

A) Gel de electroforesis.



B) Spots diferenciales.

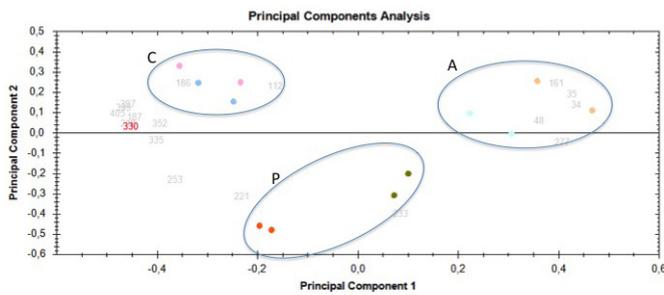


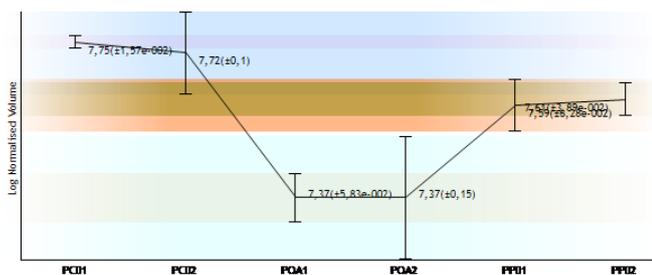
Figura 6. Identificación proteica diferencial en suero.

Cada uno de los spots diferenciales ha sido cortado y digerido, identificando la proteína que representa. Se han realizado 2 réplicas por cada uno de los pools de controles, artrosis y prótesis.

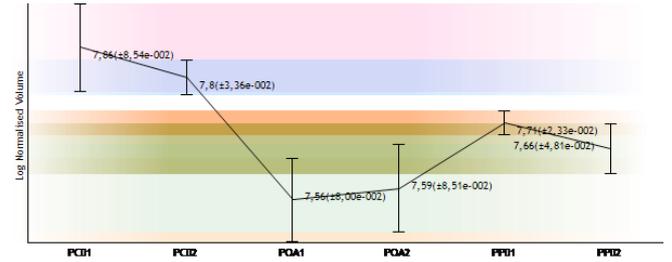
Con diferencias entre grupo  $p < 0,01$  finalmente se han aislado 7 proteínas y con  $p < 0,05$ , 5 proteínas.

**$P < 0,01$ .**

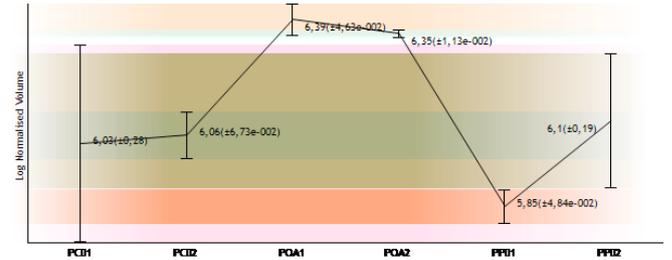
Apolipoproteína A IV.



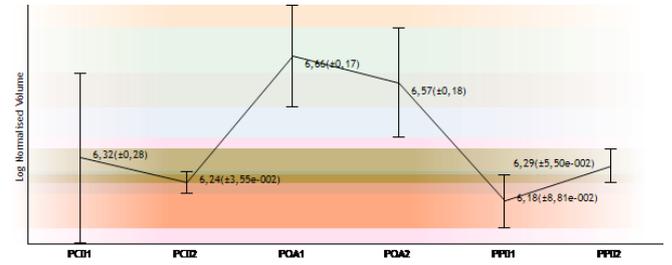
Alfa 1 antitripsina.



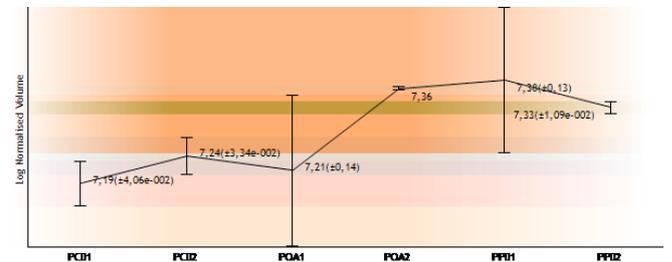
Factor B del complemento.



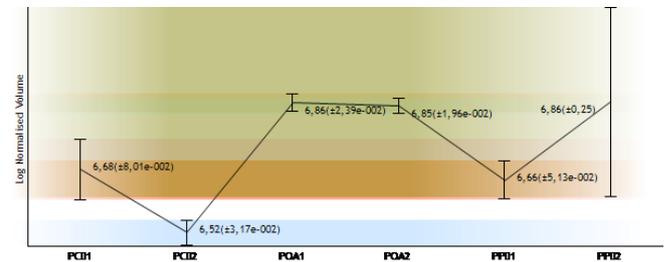
Alfa 2 macroglobulina.



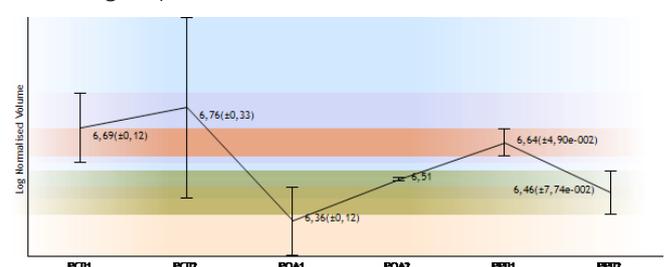
Hemopexina.



IG Kappa región C.

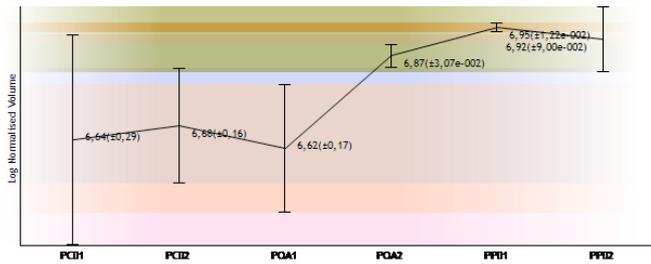


Alfa 1B glicoproteína.

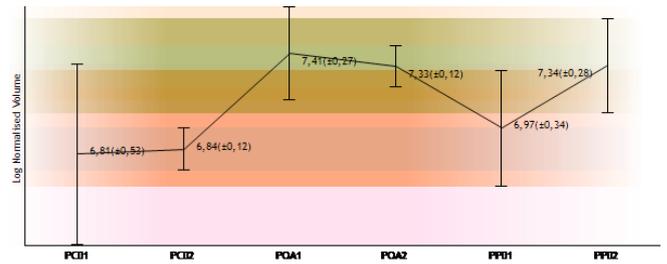


P < 0,05.

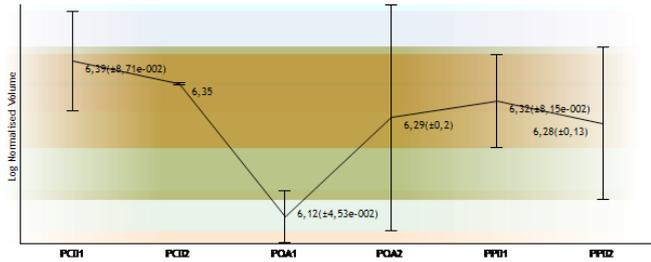
IG alfa 1 región C.



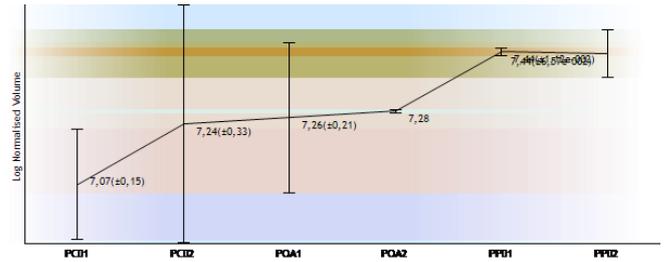
Serotransferrina.



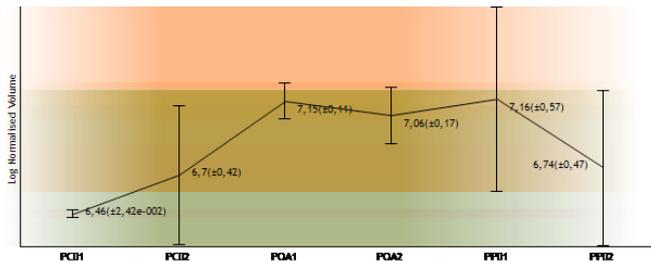
Zinc alfa 2 glicoproteína.



Haptoglobina.



Inhibidor de la proteasa plasmática C1.



El resumen de los niveles de expresión proteica y la función de las proteínas aisladas se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Resumen de las proteínas aisladas, niveles y función (A= artrosis, P= prótesis).

	Nivel respecto a control		Función proteína
	Aumentado	Disminuido	
<b>Apolipoproteína A IV</b>		A P	Vía del colesterol
<b>Alfa 1 antitripsina</b>		A P	Respuesta fase aguda
<b>Factor B del complemento</b>	A		Vía del complemento alternativa
<b>Alfa 2 macroglobulina</b>	A		Vía intrínseca coagulación
<b>Hemopexina</b>	P		Homeostasis hierro
<b>IG Kappa región C</b>	A		Vía clásica del complemento
<b>Alfa 1B glicoproteína</b>		A P	Respuesta fase aguda
<b>IG alfa 1 región C</b>	P		Respuesta inmune
<b>Zinc alfa 2 glicoproteína</b>		A P	Procesado antigénico
<b>Inhibidor de la proteasa plasmática C1</b>	A P		Vía intrínseca de la coagulación
<b>Serotransferrina</b>	A P		Homeostasis hierro
<b>Haptoglobina</b>	A P		Respuesta fase aguda

## VALORACIÓN FINAL

Tras finalizar la realización del trabajo podemos decir que nos hemos acercado al objetivo principal del mismo: determinar la presencia de un perfil proteómico (biomarcadores) específico en suero y orina en pacientes con artrosis de rodilla. Perfil para diagnóstico.

En orina se han procesado los perfiles peptídicos obtenidos mediante dos estrategias diferentes aunque complementarias: estrategia de clasificadores e identificación de picos discriminantes.

C4.5 (J48)	0,672	0,731	0,402	0,690	0,819	0,498	0,750	0,970	0,766
------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Por este motivo se ha planteado un problema más sencillo, biclase.

Problema biclase. Los resultados obtenidos por los clasificadores en este caso son notablemente mejores, destacando, de nuevo, los obtenidos por el clasificador C4.5, cuyo índice MCC se mantiene en 0,786 en ambas cla-

C4.5 (J48)	0,980	0,750	0,786	0,750	0,980	0,786
------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Los clasificadores ideales son los que tienen valores por encima de 0,8. Tras conseguir un valor muy cercano y tras los malos resultados iniciales estamos satisfechos con la capacidad identificadora de nuestro sistema.

Orina. Identificación de picos discriminantes.

El resultado ha sido la identificación de 9 picos discriminantes en ambos casos, presentando todos ellos un q-valor  $< 0,05$ , lo que indica un comportamiento significativamente distinto en dos o más clases. Tras revisar el valor de los picos identificados, se puede observar como la coincidencia de las dos listas de picos casi total, diferenciándose ambas únicamente en dos picos. Esto indica que los picos discriminantes identificados permiten, principalmente, distinguir la clase control del resto de clases, apuntando hacia una carencia de picos discriminantes entre las condiciones prótesis y artrosis. De este modo, se confirma lo visto en los resultados de la evaluación de clasificadores, donde los valores de los estadísticos para estas dos condiciones resultaron inferiores a los obtenidos para la condición control.

Hemos optimizado además un método para la conservación a medio plazo de las muestras de orina, que permite la recuperación a largo de un mes de la cantidad suficiente de proteínas para ser procesada.

En cuanto al suero, corroboramos, de nuevo, la utilidad del método de doble depleción proteica para la obten-

Estrategia de clasificadores. Se trata de encontrar una configuración informática que nos permita identificar a que grupo determinado pertenece una muestras analizada.

Se han planteado como problema triclase (prótesis, artrosis y controles) y como biclase (casos y controles).

Problema triclase. Se destacan los resultados del clasificador C4.5, obteniendo un valor de MCC de 0,766 para la clase control y manteniéndose por encima de 0,4 para el resto de las clases. Aun así, los resultados obtenidos por los clasificadores indican que aún existe un amplio margen de mejora.

ses. Además, es notable la sensibilidad obtenida por los clasificadores en general respecto a los casos, indicando la baja probabilidad de no identificar un paciente con una patología como tal. Por otro lado, la especificidad de los casos resulta ligeramente baja.

ción de proteínas minoritarias. Además de demostrar la existencia de un grupo de proteínas diferenciales en cada uno de los grupos.

Se han aislado 7 proteínas con diferencias entre grupos  $p < 0,01$  y 5  $p < 0,05$ , como posibles biomarcadores que han de ser confirmados mediante estudios posteriores de ELISA.

Apolipoproteína A IV
Alfa 1 antitripsina
Factor B del complemento
Alfa 2 macroglobulina
Hemopexina
IG Kappa región C
Alfa 1B glicoproteína
IG alfa 1 región C
Zinc alfa 2 glicoproteína
Inhibidor de la proteasa plasmática C1
Serotransferrina
Haptoglobina

Presentaron niveles proteicos menores en los grupos de prótesis y artrosis que en el grupo control: apolipoproteína A IV, Alfa 1 antitripsina, alfa 1B glicoproteína y zinc alfa 2 glicoproteína.

Presentaron niveles proteicos mayores en los grupos de prótesis y artrosis que en el grupo control: inhibidor de la proteasa plasmática, serotransferrina y haptoglobina.

Presentaron niveles proteicos mayores en el grupo de prótesis que en el grupo control: hemopexina y Ig alfa 1 región C.

Presentaron niveles proteicos mayores en el grupo artrosis que en el grupo control: factor B del complemento, alfa 2 macroglobulina y Ig kappa región C.

No podemos finalizar este informe sin agradecer a Mapfre y a todas las personas relacionadas con las becas, la oportunidad que nos han dado de trabajar en este enriquecedor estudio de investigación traslacional y multidisciplinar.

## ANEXO I: POOLES

### Control Group

Pool C1	
No. of patients	25
age	66.2 ± 7.2
% female	48,0
range	54-85

### Control Group

Pool C2	
No. of patients	25
age	64.7 ± 6.3
% female	52,0
range	54-83

### Control Group

Pool C3	
No. of patients	25
Age	65.0 ± 7.2
% female	80,0
Range	54-83

Se ha realizado un tercer pool de control para conseguir un porcentaje de mujeres similar al del grupo de prótesis y artrosis.

### Group P

Pool P1	
No. of patients	25
Age	69.6 ± 7.3
% female	71,0
Range	53-83

### Pool P2

No. of patients	25
age	69.2 ± 6.9
% female	71,0
range	54-81

### Group A

Pool A1	
No. of patients	25
Age	66.6 ± 8.0
% female	84,0
Range	55-84

### Pool A2

No. of patients	25
age	66.2 ± 8.0
% female	80,0
range	54-84