

Artículo original

Polimorfismo del D repetido en gen ASPN en osteoartritis de rodilla en mujeres de Torreón, Coahuila. Estudio de casos y controles

Arellano-Pérez-Vertti RD,* Argüello-Astorga JR,** Cortéz-López ME,*** Zamarripa-Mottú JI,**** García-Salcedo JJ,***** Luna-Ceniceros DA*****

Universidad Autónoma de Coahuila

RESUMEN. *Antecedentes:* La osteoartritis de rodilla (OA) es uno de los trastornos articulares más comunes e incapacitantes del sistema musculosquelético, que afecta a cualquier grupo étnico y ocasiona grados variables de discapacidad. Diversos factores de riesgo se han relacionado con el desarrollo y progresión de la enfermedad como son: la edad, factores genéticos, factores ocupacionales, traumatismos, menopausia, diabetes mellitus, obesidad, género, entre otros más. La distinción de estos factores en forma individual o conjunta es importante con el fin de prevenir o diagnosticar y tratar en forma temprana la enfermedad. *Métodos:* Se llevó a cabo un estudio de casos y controles en 260 mujeres de Torreón, Coahuila, analizando la asociación entre la osteoartritis primaria de rodilla y el polimorfismo del repetido D del gen ASPN (asporina). Se incluyeron 130 mujeres con osteoartritis de rodilla y 130 mujeres controles sanas. *Resultados:* En este estudio, la menopausia y la variante alélica D16 se asociaron como factores de riesgo significativos para el desarrollo de osteoartritis de rodilla ($p = 0.002$, OR 2.656, IC 95% 1.412-4.998; $p = 0.026$, OR 2.418, IC 95% 1.111-

ABSTRACT. *Background:* Knee osteoarthritis (OA) is one of the most common and disabling disorders of the musculoskeletal system. It may affect any ethnic group and causes variable degrees of disability. Various risk factors have been associated with the development and progression of this condition, such as: age, genetic and occupational factors, trauma, menopause, diabetes mellitus, obesity, and gender, among others. Distinguishing these factors, whether individually or altogether, is important to prevent or diagnose and treat the disease early on. *Methods:* A case-control study was conducted in 260 females in Torreón, Coahuila, to analyze the relationship between primary knee osteoarthritis and the D-repeat polymorphism in the ASPN gene (asporin). 130 females with knee osteoarthritis and 130 healthy female controls were included. *Results:* In this study, menopause and the D16 allele variant were found to be significant risk factors for knee osteoarthritis ($p = 0.002$, OR 2.656, CI 95% 1.412-4.998; $p = 0.026$, OR 2.418, CI 95% 1.111-5.263, respectively). The D12 variant was found to be a significant protective allele. *Conclusions:* As far as we know, this is the first case-control study in Mexican women that suggests that

Nivel de evidencia: III

* Catedrático Investigador. Departamento de Ortopedia y Traumatología, Facultad de Medicina, Unidad Torreón.

** Catedrático Investigador. Departamento de Inmunología y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Unidad Torreón.

*** Catedrático Investigador. Facultad de Medicina, Unidad Torreón.

**** Residente del cuarto grado de Ortopedia y Traumatología, Hospital Universitario.

***** Catedrático Investigador. Departamento de Geriatría, Facultad de Medicina, Unidad Torreón.

***** Estudiante de pregrado de la Facultad de Medicina, Torreón.

Universidad Autónoma de Coahuila.

Dirección para correspondencia:

Dr. Pérez Vertti

Avenida Morelos Núm. 900,
Oriente, CP 27000, Torreón, Coahuila, México.

Teléfono: (52) 871 713 67 83

E-mail: arellanodanie1969@gmail.com

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medicgraphic.com/actaortopedia>

5.263, respectivamente). La variable D12 mostró significancia como alelo de protección. Conclusiones: Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio de casos y controles en mujeres mexicanas en el que se sugiere a la menopausia y el polimorfismo del repetido D del gen ASPN asociados a la OA de rodilla.

Palabras clave: osteoartritis, rodilla, factores de riesgo, polimorfismo genético, mujeres.

menopause and the D-repeat polymorphism in the ASPN gene are associated with knee OA.

Key words: osteoarthritis, knee, risk factor, polymorphism genetic, women.

Introducción

La osteoartritis (OA) de rodilla es una enfermedad crónico-degenerativa incapacitante que ocurre como resultado de la interacción entre múltiples factores de riesgo. Comúnmente la edad, sexo, predisposición genética, obesidad, trauma, factores hormonales y ocupacionales son considerados importantes en la patogenia de la enfermedad.^{1,2}

Esta enfermedad se caracteriza por áreas de pérdida focal del cartílago, estrechamiento del espacio articular, formación de osteofitos y esclerosis subcondral. Es muy común en el paciente anciano y es una causa mayor de dolor y de discapacidad física, ocasionando severas limitaciones funcionales, afección de la calidad de vida y dependencia.

De las enfermedades reumáticas, la OA de rodilla es una de las más frecuentes en el mundo. Algunos estudios han mostrado una prevalencia de 7.5 a 13.6% en países asiáticos.³ En México, la Encuesta Nacional de Salud (ENSA II) de 1998 la ubica como la segunda causa de morbilidad con 14% en personas mayores de 60 años de edad.⁴ En otro estudio realizado por Cardiel y colaboradores, la prevalencia de la enfermedad en población mexicana fue estimada entre 2.3 a 11%.⁵ Recientemente, se publicaron los resultados de la reunión multidisciplinaria de expertos en diagnóstico y tratamiento de la osteoartritis, en la que se estableció una prevalencia de OA de rodilla de 23.9% sin especificar el género (IC 95% 23.6 a 24.2).⁶

Diferentes estudios han mostrado que los factores de riesgo más comúnmente asociados en el desarrollo de osteoartritis de rodilla son la obesidad (42.4%), la menopausia (66.7%), la historia familiar de OA (43.2%) y las lesiones previas en la rodilla (19.5%). Sin embargo, un efecto genético significativo ha sido reportado en muchos estudios, favoreciendo no sólo el inicio, sino la progresión de la enfermedad.^{7,8,9}

Recientemente, Kizawa y colaboradores⁹ reportaron una asociación entre la OA de rodilla y cadera y el gen que codifica para asporina (gen ASPN). Resultados similares han sido observados en otras poblaciones asiáticas.¹⁰ En otros dos estudios,^{11,12} este polimorfismo ha sido asociado con la OA de rodilla en población griega y del Reino Unido, con los alelos D15 y D14 actuando como factores de riesgo

para la enfermedad. No obstante, esta asociación no ha sido replicada en otros estudios, sugiriendo que las diferencias étnicas pueden jugar un papel crucial. Esto enfatiza la necesidad de llevar a cabo más estudios para detectar reales asociaciones entre el polimorfismo ASPN y la OA de rodilla.¹³

La asporina es una proteína de la matriz extracelular del cartílago que se caracteriza por tener residuos de ácido aspártico en la región N-terminal en cantidad de 8 a 19.¹⁴ El gen que codifica para esta proteína se encuentra en el cromosoma 9 q31.1-32. Este gen posee tripletes de repetición dentro del exón 2, los que codifican para el polimorfismo de repetidos de ácido aspártico (polimorfismo D). El mecanismo involucra a TGF-β1, el factor de crecimiento responsable de la formación de diversos tejidos entre los que se encuentra el cartílago articular. Esta citocina regula la diferenciación celular, la proliferación, apoptosis y migración celular en los tejidos musculoesqueléticos. Se ha propuesto que el mecanismo de acción de asporina es a través de la unión con TGF-β1, impidiendo la interacción de ésta con su receptor e inhibiendo la expresión de los genes que codifican para los componentes de la matriz extracelular, colágeno y agrecano (Agc-1 y Col2a1).^{9,15,16}

Por lo anteriormente descrito y la falta de estudios en nuestra población al respecto, exploramos el efecto del polimorfismo del gen ASPN en pacientes mujeres con OA primaria de rodilla en una población del norte de México. Consideramos la población femenina debido a que el ratio mujeres-hombres para la OA en población mexicana se ha reportado como 2:1.¹⁷

El objetivo del presente estudio fue analizar la asociación entre los polimorfismos del repetido D del gen ASPN y una población de mujeres mexicanas con OA primaria de rodilla y controles sanos.

Material y métodos

Entre Febrero de 2010 y Febrero de 2012, se realizó un estudio de casos y controles no pareado con 260 participantes mujeres (130 casos y 130 controles). Todas las participantes eran mexicanas mestizas, originarias y residentes de la ciudad de Torreón, Coahuila, México. Los casos y controles fueron evaluados clínica y radiográficamente por un ortopedista.

El grupo de OA primaria de rodilla consistió de 130 participantes mujeres quienes fueron diagnosticadas de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Reumatología¹⁸ y con base en los criterios radiográficos de Kellgren y Lawrence.¹⁹

Las radiografías fueron tomadas con soporte de peso en proyecciones antero-posterior y lateral en flexión a 30°. Todos los casos fueron seleccionados en forma no probabilística y consecutiva de dos instituciones médicas: Hospital del Magisterio y del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado, ambos localizados en Torreón, Coahuila, México, en las que reciben asistencia en forma regular. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: 1) 40 años de edad o mayores, 2) nacidos y residentes de Torreón, Coahuila, 3) ambos sexos, 4) diagnosticados por primera vez con OA de rodilla y 5) firma de consentimiento informado de manera voluntaria.

Las pacientes con artritis reumatoide, artritis asociadas con enfermedades autoinmunes, infecciosas, posttraumática, metabólicas, mala alineación, enfermedades congénitas o displasias esqueléticas fueron excluidas. Ninguno de los sujetos clasificados como casos había recibido tratamiento.

Por otra parte, los controles sanos ($n = 130$), originarios y residentes de la misma ciudad, fueron seleccionados en forma aleatoria, el día en que se seleccionaba un caso, no tenían lazos familiares con las pacientes y en el momento de la selección asistían en forma regular a las mismas instituciones médicas que los casos por enfermedades no reumáticas ni ortopédicas.

De acuerdo con los criterios de K-L, los sujetos fueron definidos como osteoartritis de rodilla para los grados 2-4 y sin OA de rodilla los grados 0-1.

Otros parámetros clínicos que pudieran confundir los resultados y que han sido reportados como factores de riesgo para la enfermedad tales como edad, género, índice de masa corporal > 30 (IMC) de acuerdo con los criterios de la OMS, menopausia, diabetes mellitus, tabaquismo, terapia estrogénica, historia familiar de OA en rodilla se incluyeron en el análisis estadístico.^{20,21} La asignación de los valores de

cada alelo fueron asignados por un investigador que desconocía el estado de caso y control.

Se tomaron muestras de sangre periférica de todos los participantes y recolectadas en tubos EDTA. La metodología para la extracción del DNA y la determinación de los repetidos D del polimorfismo del gen ASPN se realizaron de acuerdo con lo descrito en la bibliografía.²²

La técnica de PCR fue utilizada para genotipificar el repetido D con *forward* primer marcado Cy5 5'-TCCTA-GACTGGTCTTACACT-3' y primer *reverse* 5'-TCT-GAGCAATGTACAACCTCGTG-3'.²³

El tamaño de los alelos marcados con fluorescencia fue determinado por análisis en geles de poliacrilamida (PAGE) a 8% empleando el software secuenciador ALF express (Amersham-Pharmacia Biotech).

Este estudio fue realizado siguiendo los acuerdos aprobados por la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila. Todas las personas que participaron voluntariamente en el estudio firmaron el consentimiento informado, previa explicación detallada del mismo, estando de acuerdo en que los resultados fueran publicados en revistas científicas.

De acuerdo con una proporción esperada de 0.25 y 0.10 en casos y controles respectivamente y tomando como referencia el alelo mayor de riesgo descrito previamente⁹ (D14), con un nivel de significancia de 0.05, obtenemos un tamaño muestral de 124 personas por grupo. Decidimos incluir en cada grupo 130 para obtener un poder estadístico de 0.894.

El financiamiento para la realización de este estudio fue a partir del PIFI (Programa Integral de Fortalecimiento Institucional). Esta fuente no desempeñó ningún papel en los resultados de la investigación.

Se desarrollaron los descriptivos de todas las variables a fin de conocer el comportamiento de su distribución. Para variables cualitativas se describieron en frecuencia absoluta (N) y frecuencia relativa (%). Para variables cuantitativas se describieron con medidas de tendencia central (X) y dispersión (S). Para el análisis de asociación se realizaron puntos de corte en las variables continuas con el fin de categorizar y dicotomizar. Así, para la variable edad se eligió

Tabla 1. Características clínicas de pacientes con OA de rodilla y controles sanos.

	Controles $n = 130$	OA rodilla $n = 130$	p	OR	IC 95%
Edad (< 60; > 60 años)*	53.83 (\pm 12.56)	59.05 (\pm 14.25)	0.006	2.132	1.231-3.693
Índice de Masa Corporal (< 30; > 30)	28.39 (\pm 5.24)	28.44 (\pm 4.09)	0.341	0.731	0.384-1.395
Diabetes mellitus*	31 (23.8%)	50 (38.5%)	0.011	1.996	1.168-3.412
Tabaquismo*	24 (18.5%)	12 (9.2%)	0.031	0.449	0.214-0.942
Menopausia*	65 (50%)	99 (76.2%)	0.000	3.194	1.880-5.426
Uso de estrógenos	13 (10.1%)	11 (8.3%)	0.626	0.811	0.349-1.883
Historia familiar	10 (7.7%)	7 (5.4%)	1.000	1.000	0.235-1.724

Para las variables categóricas se describen frecuencias y porcentajes.

Para las variables continuas se describen el promedio y desviación estándar (\pm).

* $p < 0.05$, para determinar la significancia se empleó la prueba de χ^2 .

como punto de corte a \leq 60 años y para el IMC fue un índice \leq 30, de acuerdo con la clasificación de obesidad por la OMS. La comparación del grupo de casos con el grupo de controles se llevó a cabo a partir de la categorización y dicotomización de las variables numéricas y categóricas polítómicas. Se empleó la prueba χ^2 de Pearson en tablas 2 x 2, estableciendo un nivel de significancia de $p < 0.05$. Para la cuantificación del riesgo se utilizó la medida de asociación *odds ratio* (OR) con sus respectivos intervalos de confianza a 95%; posteriormente un modelo regresión logística binaria fue empleado para probar la influencia de otras covariables además de los alelos que resultaron significativos. Las covariables fueron: edad, sexo, IMC, estado de la menopausia, empleo de terapia hormonal estrogénica, diabetes mellitus, tabaquismo y antecedente heredofamiliar. Para el ajuste se emplearon las covariables estadísticamente significativas y que han sido consideradas como factores de riesgo o de protección.

Resultados

En este estudio se incluyeron un total de 260 participantes: 130 con osteoartritis primaria de rodilla y 130 controles sanos.

Las características clínicas de las participantes se describen en la *tabla 1*. En esta tabla se observan aquellas variables no alélicas que muestran significancia estadística como factores de riesgo o protección en esta muestra de la población. Es notable que la variable tabaquismo se manifiesta como

factor de protección. Para el análisis del polimorfismo sólo fueron considerados los alelos D12, D13, D14, D15, D16 y D17. Los alelos D8, 11 y D18 no se incluyeron dado que sus frecuencias eran menores. En nuestra muestra, el alelo D13 fue el más común con una frecuencia en casos y controles de 65.4%; las frecuencias alélicas se describen en la *tabla 2*.

Los *odds ratio* para cada alelo, sin ajuste, son presentados en la *tabla 3*. En ésta puede observarse que el alelo D16 se muestra significativo como factor de riesgo, mientras que el alelo D12 se muestra como factor de protección.

Se llevó a cabo un análisis de regresión logística binaria en la que se incluyen para el ajuste las variables que en el análisis bivariado resultaron con significancia estadística y aquellas que, aun sin resultar estadísticamente significativas, han sido consideradas como factores de riesgo para la enfermedad. De esta manera podemos observar que la menopausia y la variable alélica D16 se muestran como factores de riesgo. La variable D12 se mostró como factor de protección, por lo que en un análisis separado de regresión logística, fue ajustada por tabaquismo y empleo de terapia estrogénica (dado que ambos se mostraron con tendencia a ser factores de protección). El análisis de regresión se muestra en la *tabla 4*.

Discusión

En este estudio epidemiológico, que contó con 260 participantes, reportamos en una población del norte de México

Tabla 2. Frecuencias alélicas de los repetidos D del polimorfismo del gen APN en mujeres mexicanas.

	Alelo	D8	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18
OA rodilla n (130)	Cuenta	0	0	6	85	49	39	24	8	1
	Frecuencia (%)	0	0	4.6	65.4	37.7	30	18.5	6.2	0.8
Controles n (130)	Cuenta	2	1	15	85	51	36	12	5	2
	Frecuencia (%)	1.5	0.8	11.5	65.4	39.2	27.7	9.2	3.8	1.5

Tabla 3. Odds ratio sin ajuste para cada alelo.

Alelo	p	OR	IC 95%
D8	0.156	0.496	0.439-0.561
D11	0.316	0.498	0.441-0.563
D12*	0.041	0.371	0.139-0.989
D13	1.000	1.000	0.600-1.667
D14	0.799	0.937	0.568-1.545
D15	0.681	1.119	0.654-1.914
D16*	0.031	2.226	1.061-4.671
D17	0.393	1.639	0.522-5.151
D18	0.561	0.496	0.044-5.540

* $p < 0.05$ (fue usada la prueba de χ^2 para determinar la significancia).

Tabla 4. Análisis de regresión logística binaria.

Variables	p	OR	IC 95%
Edad	0.457	1.289	0.660-2.514
Menopausia*	0.002	2.656	1.412-4.998
IMC	0.203	1.450	0.818-2.570
Diabetes	0.485	1.246	0.672-2.311
Alelo D16*	0.026	2.418	1.111-5.263
Antecedente hereditario	0.555	1.847	0.241-14.171
Alelo D12**	0.011	0.285	0.109-0.749
Tabaquismo	0.057	0.586	0.338-1.016
Terapia estrógenos	0.541	0.763	0.321-1.813

* Ajustado por edad, menopausia, diabetes, IMC, antecedente hereditario.

** Ajustado por terapia con estrógenos y tabaquismo.

la asociación del polimorfismo del repetido D del gen ASPN y la OA primaria de rodilla en mujeres. En las mujeres, a partir de los 45 años, la prevalencia de OA sintomática de rodilla es de 18.7%.^{17,24}

La OA es una enfermedad compleja, multifactorial, en la que factores genéticos y no genéticos influyen en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Actualmente se han incrementado los esfuerzos por identificar genes que codifiquen para incrementar la susceptibilidad a la OA.

En este estudio, identificamos nueve alelos que contienen de 8 a 18 repetidos D, en contraste con lo reportado por el estudio japonés (10 a 19 repetidos) de Kizawa y colaboradores,⁹ en el cual reportaron una asociación entre OA de rodilla y cadera y el alelo D14 ($p = 0.0013$, *odds ratio* [OR] = 2.49). La asociación fue replicada en un estudio separado de casos y controles para OA de rodilla ($p = 0.018$, OR = 1.66) en la misma población. Mustafa y colaboradores,¹² en un estudio en población del Reino Unido sólo encontraron una asociación marginal en varones con OA de cadera y el alelo D14 OA ($p = 0.025$, OR = 1.41). Un estudio de casos y controles en población griega¹¹ en el que se incluyen pacientes postoperados de reemplazo articular de rodilla, mostró al alelo D13 asociado con disminución en el riesgo de sufrir OA de rodilla ($p = 0.002$, OR = 0.62), pero el alelo D14 no incrementó el riesgo ($p = 0.65$, OR = 1.1). Sin embargo, encontraron una asociación significativa con el alelo D15 ($p = 0.018$, OR 1.54). Otro estudio en la población de la etnia han de China se detectó una asociación significativa entre el alelo D14 y la OA de rodilla ($p = 0.0013$, OR = 2.04), aunque la asociación del alelo D13 como factor de protección no fue replicada ($p = 0.4$, OR = 1.11).¹⁰

Los hallazgos en población mexicana difieren de lo descrito en la literatura. En este estudio, dos alelos fueron asociados con la OA primaria de rodilla en mujeres: el alelo D16 como factor de riesgo y el alelo D12 como factor de protección. El análisis de regresión logística, ajustado por covariables como edad, menopausia, IMC, diabetes, el antecedente hereditario, tabaquismo y terapia estrogénica mostró la significancia de estos alelos, que fue descrita en el análisis no ajustado. Además, el estado de menopausia también se asoció como factor de riesgo, lo que resalta la importancia de considerarla en este tipo de estudios de asociación. Por otra parte, el alelo D12 conservó la significancia como factor de protección posterior al ajuste en el análisis de regresión con la terapia estrogénica y el tabaquismo. Las variables como edad, IMC y diabetes mellitus, aun y cuando en el análisis de regresión no mostraron significancia estadística, su valor como factores de riesgo ya descritos para la OA, no están en duda.

Aún no se ha determinado si las propiedades funcionales de los alelos D16 y D12 son semejantes a las descritas para D13 y D14.⁹ Es importante determinar si el tamaño del repetido D influye en la actividad cualitativa de asporina.

Possiblemente un incremento y disminución en el número de repetidos D modifica el riesgo de desarrollar la enfermedad, quizás alterando la capacidad de asporina para unirse a

TGF-β. La discrepancia de resultados puede ser debido a diferencias étnicas y genéticas tal y como ha sido reportado en un meta-análisis de asociación por Nakamura y colaboradores.¹³

Por otra parte, las fuentes potenciales de sesgo en este trabajo son los siguientes: los pacientes fueron seleccionados de centros hospitalarios que atienden los problemas degenerativos articulares y éstos pueden sólo representar los casos más severos de OA en rodilla que buscan tratamiento definitivo a su enfermedad. Otra fuente de sesgo podría ser el de memoria, en lo que respecta al antecedente heredofamiliar, aunque si bien es cierto que se aplicaron cuestionarios para tratar de controlar lo anterior. El tamaño muestral también puede ser limitación de este estudio pero a través de los criterios estrictos de inclusión de pacientes que por primera vez eran diagnosticados con OA de rodilla se intenta superar lo anterior.

Finalmente, consideramos necesario replicar estas asociaciones en estudios independientes y muestras más grandes en diferentes grupos étnicos del país, para confirmar el papel que los polimorfismos del repetido D del gen ASPN tienen como factores de riesgo y protección para OA de rodilla en población mexicana.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en la realización de este trabajo.

Bibliografía

1. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, et al: Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* 2000; 133: 635-46.
2. Spector TD, Cucutini F, Baker J, Loughlin J, Hart D: Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ.* 1996; 312: 940-3.
3. Bijerk C, Houwing-Duistermaat JJ, Valkenburg HA, Meulenbelt I, Hofman A, Breedveld FC, et al: Heritabilities of radiologic osteoarthritis in peripheral joints and of disc degeneration of the spine. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 1729-35.
4. de Pavia-Mota E, Larios-González MG, Briceño-Cortés M: Manejo de la osteoartritis. *Med Fam.* 2005; 7: 93-8.
5. Cardiel MH, Rojas-Serrano J: Community based study to estimate prevalence, burden of iones and help seeking behavior in rheumatic diseases in Mexico City. A COPCORD study. *Clin Exp Rheumatol.* 2002; 20: 617-24.
6. Espinosa-Morales R, Arce-Salinas CA, Cajigas-Melgoza JC, Esquivel Valero JA, Gutiérrez-Gómez JJ, Martínez Hernández JL, et al: Reunión multidisciplinaria de expertos en diagnóstico y tratamiento de pacientes con osteoartritis. Actualización basada en evidencias. *Med Int México.* 2013; 29(1): 67-92.
7. Sakao K, Takahashi KA, Arai Y, Saito M, Honjyo K, Hiraoka N, et al: Asporin and transforming growth factor-beta gene expression in osteoblasts from subchondral bone and osteophytes in osteoarthritis. *J Orthop Sci.* 2009; 14: 738-47.
8. Gill MR, Oldberg A, Reinhold FP: Fibromodulin-null murine knee joints display increased incidences of osteoarthritis and alterations in tissue biochemistry. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; 10: 751-7.
9. 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.

10. Jiang Q, Shi D, Yi L, Ikegawa S, Wang Y, Nakamura T, et al: Replication of the association of the aspartic acid repeat polymorphism in the asporin gene with knee osteoarthritis susceptibility in Han Chinese. *J Hum Genet.* 2006; 51: 1068-72.
11. Kaliakatsos M, Tzetzis M, Kanavakis E, Fytilli P, Chouliaras G, Karachalias T, et al: Asporin and knee osteoarthritis in patients of Greek origin. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14: 609-11.
12. Mustafa Z, Dowling B, Chapman K, Sinsheimer JS, Carr A, Loughlin J: Investigating the aspartic acid (D) repeat of asporin as a risk factor for osteoarthritis in a UK Caucasian population. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 3502-6.
13. Nakamura T, Shi D, Tzetzis M, Rodríguez-López J, Miyamoto Y, Tsiezou A, et al: Meta-analysis of association between the ASPN D-repeat and osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 1676-81.
14. Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ, Heinegard D: Identification and characterization of asporin. A novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12201-11.
15. Nakajima M, Kizawa H, Saitoh M, Kou I, Miyazono K, Ikegawa S: Mechanisms for asporin function and regulation in articular cartilage. *J Biol Chem.* 2007; 282: 32185-92.
16. Kou I, Nakajima M, Ikegawa S: Binding characteristics of the osteoarthritis-associated protein asporin. *J Bone Miner Metab.* 2010; 28: 395-402.
17. Cajigas JC, Ariza Andraca R, Espinosa Morales R, Méndez Medina C, Mirassou Ortega M, Robles San Román, et al: Guía de práctica clínica basada en la evidencia para el diagnóstico y tratamiento de la osteoartritis. *Med Int Mex.* 2011; 27(6): 552-72.
18. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al: Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 1986; 29: 1039-49.
19. Kellgren JH, Lawrence JS: Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1957; 16: 494-502.
20. Iqbal MN, Haidri FR, Motiani B, Mannan A: Frequency of factors associated with knee osteoarthritis. *J Pak Med Assoc.* 2011; 61: 786-9.
21. Spector TD, MacGregor AJ: Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004; 12 Suppl A: S39-44.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215.
23. Torres B, Orozco G, García-Lozano JR, Oliver J, Fernández O, González-Gay MA, et al: Asporin repeat polymorphism in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66: 118-20.
24. Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, et al: Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: The Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol.* 2007; 34(1): 172-80.