



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Trabaja de fin de grado

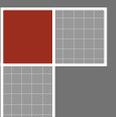
2014

**CARACTERIZACIÓN DE CÍBRIDOS  
TRASMITOCONDRIALES**

**CHARACTERIZATION OF  
TRANSMITOCHONDRIAL CYBRIDS**

**CARACTERIZACIÓN DE CÍBRIDOS  
TRASMITOCONDRIAIS**

BEATRIZ VIDAL BRETAL



**Francisco Blanco García**, Doctor en Medicina, Director científico del Instituto de investigaciones Biomédicas da Coruña (INBIC)-Complejo Hospitalario de A Coruña (CHUAC). **Mercedes Fernández Moreno** Doctora en biología, investigadora postdoctoral del área de genómica del Instituto de investigaciones Biomédicas da Coruña (INBIC)-Complejo Hospitalario de A Coruña (CHUAC).

INFORMAN:

Que el presente trabajo de Fin de Grado titulado “**Caracterización de cibridos transmitocondriales**” que para optar al Grado de Biología presenta **Doña Beatriz Vidal Bretal**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el área de genómica del laboratorio de investigación del INIBIC, y que hallándose concluido, autorizamos a su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

A Coruña, Julio 2014

  
Francisco Blanco García

  
Mercedes Fernández Moreno

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>OBJETIVOS</b> .....	9
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	10
- Obtención de cíbridos transmitocondriales.....	11
- Obtención y cuantificación ácidos nucleicos.....	12
- Ensayo <i>Single Base Extension</i> (SBE).....	13
- Cultivo celular estimulado con interleuquina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ).....	14
- RT-PCR ( <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> ) .....	15
- Cuantificación relativa usando genes de referencia.....	15
- Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	16
- Análisis estadístico.....	17
<b>RESULTADOS</b> .....	18
<b>DISCUSIÓN</b> .....	26
<b>CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	32

## RESUMEN

**Introducción:** Los cíbridos se obtuvieron a partir de líneas celulares inmortales desprovistas de ADN mitocondrial (ADNmt) (línea celular Rho-0) con plaquetas que portan el ADNmt. Con estas construcciones se puede estudiar el papel de los polimorfismos de una única base (SNPs) presentes en el ADNmt al tener el mismo fondo nuclear de ADN. Para confirmar la patogénesis y los tratamientos eficaces para enfermedades asociadas al ADNmt, estos modelos celulares son de gran utilidad. Algunos estudios indican que las mitocondrias están implicadas en la OA y que los haplogrupos de ADNmt contribuyen en la prevalencia y gravedad de la OA, así, las personas con el haplogrupo J presentan un riesgo menor de desarrollar OA, y los que llevan este haplogrupo en OA desarrollan una progresión menos severa de la enfermedad. Hay una posible explicación para este efecto protector. Algunas mutaciones que caracterizan al haplogrupo J pueden reducir la eficiencia del acoplamiento de la fosforilación oxidativa y la reducción de la producción de ATP y especies reactivas de oxígeno (ROS).

**Objetivos:** Los objetivos principales de este trabajo consistieron en analizar los niveles de ROS, así como la expresión génica de dos enzimas detoxificadoras catalasa (CAT) y superóxido dismutasa 2 (SOD) y de tres genes mitocondriales NAD deshidrogenasa subunidad 1 (ND-1), citocromo B (Cyt-b) y citocromo c oxidasa subunidad 1 (COX-1) en cíbridos portadores del haplogrupo H y del J obtenidos tanto de pacientes sanos como artrósicos.

**Métodos:** Los cíbridos se generaron fusionando células 143B.TK<sup>+</sup> Rho-0 con plaquetas de pacientes sanos y artrósicos, con haplogrupos de ADNmt H y J siguiendo la metodología propuesta por Chomyn en 1996. La producción de ROS fue medida por citometría de flujo. La expresión de genes mitocondriales y genes implicados en la detoxificación fueron evaluados mediante RT-PCR en un Light Cycler 480-II.

**Resultados y Discusión:** El análisis de los niveles de ROS puso de manifiesto que los cíbridos H mostraban unos niveles más elevados que los J, dato que concuerda con los estudios previos donde se describe un papel protector del haplogrupo J en la patología artrósica, mediado entre otros factores, por una menor producción de ROS. Los niveles de expresión de las enzimas detoxificadoras analizadas (CAT y SOD) en los cíbridos concuerdan con los niveles de dichas enzimas detectados en suero de pacientes OA. Todos los datos obtenidos en el desarrollo del presente trabajo, apoyan los resultados previos y ayudan a confirmar el papel de la mitocondria en el proceso artrósico.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Cybrids were derived from immortal cell lines that have been devoid of mitochondrial DNA (mtDNA) have been developed (p0-cell line) fusion with a platelet that carry the mtDNA. These constructions could study the role of SPNs presents in mtDNA with the same nuclear DNA. To confirm the molecular pathogenesis and screen effective treatment for mtDNA associated diseases, optimal cell models for reproducing the progress of disease are valuable. Some studies indicate that mitochondria is implicated in osteoarthritis (OA) and mtDNA haplogroups contribute to the prevalence and severity in OA, in this line, people carrying haplogroup J may be a lower risk of developing OA, and those carrying this haplogroup in whom OA does not develop may have a less severe progression of the disease. There is one possible explanation for the apparent protective effect. Some of the mutations that characterize haplogroup J may reduce the coupling efficiency of oxidative phosphorylation, reducing the ATP production and ROS production.

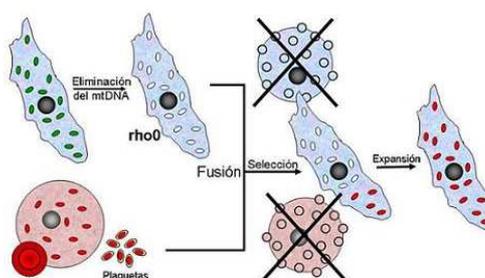
**Objectives:** The objectives of this work were, the analysis of reactive oxygen species (ROS) production, as well as the genetic expression of the two detoxification enzymes (CAT and SOD) and the three mitochondrial genes(ND-1, Cytb and COX-1) in cybrid carriers haplogroups H and J, which were obtained from healthy and osteoarthritic patients.

**Methods:** Cybrids were developed using the 143B.TK<sup>+</sup> Rho-0 and platelets from healthy and OA patients with mtDNA haplogroups H and J, following the methodology described by Chomin 1996. The production of ROS were measure by Flow Cytometry. The expression levels of genes implicated in detoxification catalase (CAT) and superoxide dismutase-2 (SOD) and mitochondrial genes NAD dehydrogenase subunit 1(ND-1), cytochrome B (Cytb) and cytochrome c oxidase subunit 1 (COX-1) were evaluated by RT-PCR in a Light Cyclor 480-II.

**Results and Discussion:** The analysis of ROS levels production revealed that H cybrids showed higher levels than J cybrids, this is accordance with previous studies where haplogroup J had described as protective in the develop of OA, controlled among other factors by a less ROS production. The expression levels of detoxification enzymes in the cybrids are in accordance with the level of such enzymes detected in serum of OA. All data the data obtained in this preliminary work are in line of previous results and help us to describe the roll of the mitochondria in OA.

# I. INTRODUCCIÓN

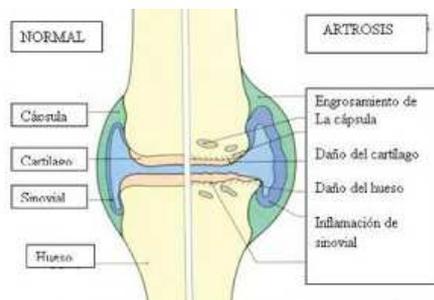
Dentro de las estrategias que ayudan a conocer el papel de la mitocondria en diversas patologías se encuentran los cíbridos trasmitocondriales que permiten analizar el papel de diversas mutaciones presentes en el ADN mitocondrial (ADNmt) bajo un mismo fondo nuclear, de manera que toda diferencia que se encuentre al analizarlos será debida únicamente al genoma mitocondrial. Los cíbridos trasmitocondriales son células resultantes de la fusión de una línea celular a la cual se le ha deplecionado el ADNmt (célula Rho-0) (generalmente mediante un largo tiempo en cultivo en presencia de Bromuro de Etidio a baja concentración) con una célula carente de núcleo pero que incorpore los polimorfismos mitocondriales que se quieren analizar (Figura 1). Dentro de estas últimas pueden ser o bien células enucleadas o células ya de por si carentes de núcleo, como las plaquetas. Después del proceso de fusión se llevan a cabo un proceso de selección, con el fin de elegir únicamente los cíbridos generados y portadores de las mutaciones a estudio y finalmente una expansión de los clones.



**Figura 1.** Esquema de la generación cíbridos trasmitocondriales. En este esquema se muestra en azul la célula que se utilizará como donante del fondo nuclear (a la que previamente se le ha eliminado el ADNmt, Rho-0) y en rojo las donantes de mitocondrias (plaquetas). Ambos tipos células se fusionan y seleccionan para eliminar las células que no se hayan fusionado correctamente y finalmente se expanden los clones correctos.

La artrosis (OA) es la enfermedad articular más frecuente en nuestro país; afectando a cerca de siete millones de españoles. Además esta patología presenta una gran importancia en cuanto al gran coste económico y social que supone, ya que es la causa más importante de incapacidad funcional y la segunda de incapacidad permanente, tras las enfermedades cardiovasculares, y además supone un gran coste sanitario.

La OA ha pasado de ser considerada una enfermedad a ser tratada como un síndrome, ya que se considera un grupo heterogéneo de procesos, con numerosos mecanismos interrelacionados, que terminan conduciendo al fracaso de la articulación, debilitando así el cartílago que claudica frente a fuerzas intensas. Esta patología se caracteriza por una degeneración y pérdida progresiva del cartílago articular hialino, la formación de osteofitos, la deformación del hueso subcondral y la inflamación de la membrana sinovial (Figura 2).



**Figura 2.** Representación de una rodilla donde se muestran los componentes de una articulación normal (a la izquierda) y las alteraciones características de un proceso artrósico (a la derecha).

El cartílago articular hialino es un tejido formado principalmente por matriz extracelular (MEC) y por un único tipo celular, los condrocitos, que serán los responsables del mantenimiento de la integridad y función del tejido. A pesar de la naturaleza glicolítica del condrocito, en los últimos años han surgido numerosas evidencias que ponen de manifiesto el papel de la mitocondria en la artrosis (Blanco *et al.*, 2011). Así, se ha descrito una reducción significativa en la actividad de los complejos II y III de la cadena de transporte electrónico y en condrocitos OA respecto a los condrocitos procedentes de un cartílago normal (Maneiro *et al.*, 2003). Además la inhibición de los complejos III y V de la cadena de transporte electrónico causa un aumento de la respuesta inflamatoria la cual puede estar relacionada con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cillero-Pastor *et al.*, 2008). Del mismo modo se ha descrito que la mayor vía de muerte celular en los condrocitos OA es la apoptosis mediada por la mitocondria (Kim and Blanco, 2007). También se ha descrito que la producción de ROS mitocondriales compromete de manera significativa la función del condrocito (Blanco *et al.*, 2004; Henrotin and Kurz, 2007) causando daño en el ADNmt y reduciendo así su capacidad para repararse (Grishko *et al.*, 2009).

Recientemente se ha puesto de manifiesto el papel de los haplogrupos de ADNmt en la patología artrósica (Rego *et al.*, 2008; 2010). Los haplogrupos de ADNmt se definen como caracteres individuales que se heredan en bloque, caracterizados por la presencia de un grupo de polimorfismos de una única base (SNPs) característicos en el ADNmt, que se han ido acumulando a lo largo de la evolución de los diferentes linajes maternos (Torroni *et al.*, 1996). Existen evidencias que reflejan la importancia de los haplogrupos en la producción de energía (Mishmar *et al.*, 2001; Ruiz-Pesini *et al.*, 2004). También son numerosos los estudios que ponen de manifiesto la asociación entre los haplogrupos y ciertas patologías (Ruiz-Pesini *et al.*, 2000; van der Walt *et al.*, 2003; Gallardo *et al.*, 2011).

Por lo descrito anteriormente, resulta útil el desarrollo de estrategias que permitan analizar directamente el papel de la mitocondria en procesos degenerativos como la artrosis, para entender su etiopatogenia y poder abordar de manera más efectiva su tratamiento por lo que

resulta muy útil el desarrollo de modelos celulares que permitan testar y/o poner de manifiesto el papel real de la mitocondria en el proceso OA.

## II. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta, tanto la relación existente entre los haplogrupos de ADNmt y la patología OA, como que algunos de los SNPs característicos de los diferentes haplogrupos pueden alterar el acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa mitocondrial afectando a la síntesis de ATP y a los niveles de ROS, en híbridos trasmitocondriales portadores del haplogrupo H y J obtenidos tanto de donantes sanos como artrósicos, se han planteado como objetivos de este trabajo:

1. Analizar los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).
2. Estudiar los niveles de expresión de tres genes mitocondriales: NADH deshidrogenasa I (ND-1), citocromo B (Cytb) y citocromo oxidasa subunidad-1 (COX-1) y la de dos enzimas detoxificadoras: Catalasa (CAT) y Superóxido Dismutasa-2 (SOD).

## III. MATERIAL Y MÉTODOS

## **OBTENCIÓN DE CÍBRIDOS TRASMITOCONDRIALES**

Los cíbridos trasmitocondriales utilizados fueron generados mediante la fusión de una célula Rho-0 (143-B.TK, cedida a la unidad de investigación del INIBIC por el grupo del Dr. Garesse del IIB-CSIC-UAM) y plaquetas obtenidas a partir de sangre total, mediante centrifugación diferencial de donantes normales (N) y OA siguiendo el protocolo descrito por Chomyn (Chomyn, 1996). Los cíbridos utilizados para desarrollar el presente trabajo, fueron desarrollados previamente tanto por el grupo de genómica como por el de cultivos celulares de la unidad de investigación del INIBIC.

Brevemente, las células Rho-0 fueron fusionadas con las plaquetas portadoras de los haplogrupos H y J tanto de N como de OA, en presencia de polietilenglicol (PEG, Sigma). Posteriormente se seleccionaron en medio de selección *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, *Invitrogen Life Technologies*) suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF, *Invitrogen*) al 10%, Penicilina 100 U/mL y Estreptomicina 100 µg/mL (P/S, *Invitrogen*) y sin uridina, durante al menos 3 semanas para finalmente aislar clones mediante dilución límite. Transcurridos entre 20-25 días se aislaron los clones a los que se les realizaron pases sucesivos para conseguir estabilizar los niveles de ADNmt. Los niveles de ADNmt de los clones fueron analizados mediante Q-PCR.

## **OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### - Extracción ADN

La extracción de ADN a partir, de sangre y de células, se llevó a cabo utilizando Invisorb® Spin Tissue Mini Kit siguiendo las instrucciones del comerciante. En resumen, la extracción se basó en una lisis celular, con un paso de fijación a membrana que a continuación se sometió a diferentes lavados para finalmente eluir el DNA.

### - Extracción ARN

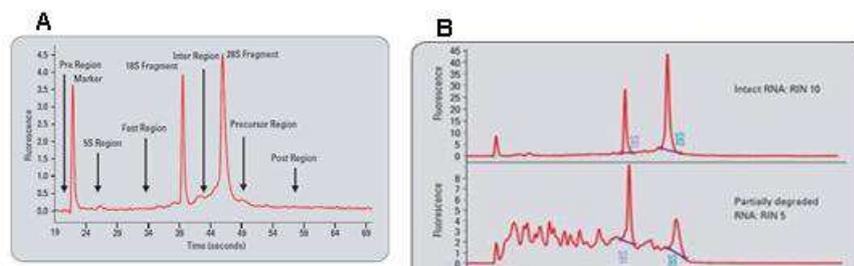
La extracción de ARN total a partir de células, se realizó mediante el uso de Trizol® Reagent. Este reactivo combinaba fenol con isotiacinato de guanidina para inhibir inmediata y efectivamente la actividad ARNasa. Las células fueron homogeneizadas en este compuesto, al que se le añadió cloroformo y tras una centrifugación se crearon dos fases; la fase inferior (orgánica) que contiene el ADN y restos de proteínas desnaturalizadas y la superior (acuosa) el ARN. La fase acuosa se

transfirió a un tubo nuevo y el ARN fue precipitado con isopropanol, y lavado con etanol para finalmente ser resuspendido en H<sub>2</sub>O.

- Cuantificación de ADN y ARN total obtenidos

Tanto el ADN como el ARN fueron cuantificados utilizando un espectrofotómetro Nanodrop-NA-1000 para conocer la concentración y pureza de cada muestra.

El RNA debido a su menor estabilidad, además de conocer su concentración fue necesario conocer su grado de integridad (*RNA Integrity Number*, RIN) para lo cual las muestras fueron analizadas en un Bioanalizador (Agilent) utilizando un RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent). El *software* Bioanalyzer generó automáticamente la relación entre el ARN ribosómico (ARNr) 18S y ARNr 28S generando así el valor del RIN para cada muestra (Figura 3A y 3B).



**Figura 3. A.** Electroferograma que detalla las regiones que son indicativas de la calidad del ARN **B.** Dos ejemplos de los diferentes valores del RIN estimados mediante una relación entre el ARNr18S y el ARNr28S.

## ENSAYO SINGLE BASE EXTENSION (SBE)

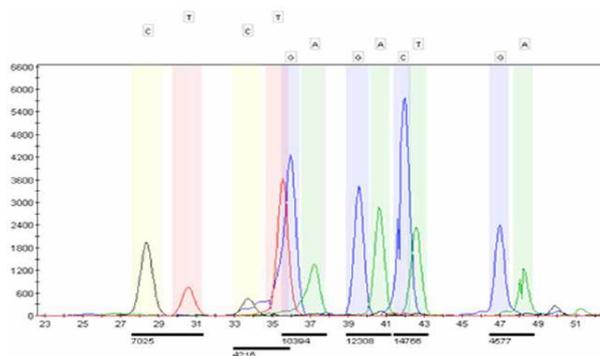
El ensayo de SBE consiste en el anillamiento de un único cebador a una secuencia de ADN mitocondrial que contiene el SNP que queremos analizar. El primer paso para desarrollar esta técnica es la realización de una PCR-*multiplex*, para lo cual previamente se diseñaron seis parejas de cebadores específicos que abarcaban los seis fragmentos mitocondriales que contienen los SNPs que definen los haplogrupos más comunes en la población europea (Tabla 1). El desarrollo y puesta a punto de esta metodología se llevó a cabo en el grupo de genómica del INIBIC (Rego *et al.*, 2007) y a día de hoy es una técnica más de su rutina de trabajo.

**Tabla 1.** Sitios polimórficos del ADNmt utilizados para asignar los seis haplogrupos europeos mayoritarios.

Haplogroup	Polymorphic sites					
	7025	14766	10394	4577	12308	4216
H	C	C	A	G	A	T
V	T	C	A	A	A	T
K	T	T	G	G	G	T
U	T	T	A	G	G	T
T	T	T	A	G	A	C
J	T	T	G	G	A	C

En resumen se realizó una PCR *multiplex* utilizando las condiciones descritas por Rego *et al.*, 2007. Posteriormente, los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% y una vez visualizados los productos de PCR fueron purificados con ExoSAP-IT (Amersham) para llevar a cabo la reacción de SBE-multiplex con Snapshot® Multiplex Kit. Para eliminar los ddNTPs no incorporados, los productos de reacción SBE fueron tratados con fosfatasa alcalina (SAP) (Amserham).

Por último, los productos de SBE purificados se mezclaron con Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) y un marcador interno (120 Liz Size Standard Applied Biosystems) para su desnaturalización (95°C durante 5 min) y posterior carga en el secuenciador capilar ABI 3100. Los datos fueron analizados en el *software* v3.5 GeneMapper (Applied Biosystem), que fue capaz de asignar los diferentes alelos (SNP) en cada locus, mediante el diseño previo de una secuencia de referencia que presentaba todas las variantes alélicas para cada locus (Figura 4).



**Figura 4.** Secuencia de referencia que abarca las variantes alélicas para cada sitio polimórfico

### **CULTIVO CELULAR ESTIMULADO CON INTERLEUQUINA 1B (IL-1β)**

La IL-1β es la principal citoquina proinflamatoria implicada en la OA, por lo que es un buen estímulo para recrear *in vitro* lo que sucede *in vivo*. Para analizar su efecto, se sembraron 100.000 células en P-100 con DMEM suplementado al 10% con SBF y P/S, durante 24

horas. Transcurrido este tiempo, las células se deplecionaron, para lo cual se les retiró el SBF hasta el 0,5% y se añadió la IL-1 $\beta$  a una concentración final de 5ng/ $\mu$ l y se incubaron 48 horas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación.

Transcurrido este tiempo las células se levantaron con tripsina, se centrifugaron y lavaron con suero salino para obtener las células que posteriormente se utilizaran para la extracción de ARN.

### **RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION)**

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) es una variante de la PCR, en la que una hebra de ARN es retrotranscrita en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa.

La retrotranscripción se realizó con SuperScript® VILO™ MasterMix (Invitrogen). Previamente, se trató el ARN con DNasa I (Invitrogen) para eliminar la posible contaminación de ADN. Posteriormente, se añadió SuperScript® VILO™ y se incubó a 25°C durante 10 minutos, seguido de 90 minutos a 42°C y una fase final durante 5 minutos a 85°C. Obteniéndose finalmente el ADNc.

### **CUANTIFICACIÓN RELATIVA USANDO GENES DE REFERENCIA**

El análisis de la expresión génica mediante Q-PCR se llevó a cabo en un Light cycler 480 II, (Roche). Se estudió la expresión de tres genes codificados por el ADNmt, la NAD deshidrogenasa subunidad 1(ND-1), Citocromo B (cyt-b) y el Citocromo c oxidasa subunidad I (COX-1), así como de dos genes implicados en el sistema detoxificante de la célula la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa subunidad-2 (SOD).

El análisis de los niveles de expresión se realizó mediante el empleo de sondas UPL, así se empleó MasterMix-UPL, cebadores específicos para cada gen a estudio (Tabla 2) y sondas específicas a cada amplificación. Los valores de expresión relativa de los genes de interés se calcularon en base a un gen de referencia con el *software* Q-Base Plus versión 2.4 (Biogazelle), teniendo en cuenta los valores de los Ct (Ciclo umbral) para cada muestra.

**Tabla 2.** Cebadores específicos para cada gen analizado (FW, Forward, Rv, Reverse)

Nombre cebador	Secuencia Fw	Secuencia Rv	Sonda UPL
RPL13A	5'-caaggggataaacaccaac-3'	5'tgtggggcagcatacctc-3'	28
SOD	5'-ctggacaaacctcagcccta-3'	5'-tpatggcttccagcaactc-3'	22
CAT	5'-tcatcaggatcccatattgtt-3'	5'-tcatgatgtctctgagattctct-3'	76
ND-1	5'-aacctdcccacctatcaca-3'	5'-tcataattggccaagggtca-3'	51
COX-1	5'-gctctgactcttacctccctd-3'	5'-ccggcctccactatagca-3'	15
Cyt-b	5'-cactdggccctcattatgc-3'	5'-gttgtttgataccggttctg-3'	10
ARNr18-S	5'-ctcaacacgggaacctcac-3'	5'-cgctccccaactaagaaag-3'	77

## PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)

Se sembraron 80.000 células en cada pocillo de una placa multipocillo de 6 con DMEM, al 10% de SBF y con Penicilina 100 U/mL y Estreptomina 100 µg/mL (*Invitrogen*). Se cultivaron 24 horas en estufa a 37°C con humedad a saturación y CO<sub>2</sub> al 5%.

Pasado el tiempo, a los pocillos que fueron seleccionados como control positivo se les añadió peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Foret*) a una concentración de 0,3 mM y las células se incubaron en su presencia durante 30 min a 37°C.

Para llevar a cabo la determinación de los niveles de producción de las especies reactivas de oxígeno, las células fueron incubadas con tres fluoróforos diferentes:

- 2,7- Dicloro dihidro fluorescina diacetato (DCFH-DA), cruza las membranas celulares y es incorporado a las células donde es convertido por las esterasas intracelulares a DCFH. En la presencia de ROS el DCFH es oxidado a dicloro-fluoresceina fluorescente (DCF) (Wang y Joseph, 1999). De manera que con el uso de este fluoróforo obtendremos la información de los ROS citoplasmáticos presentes en las células. Las células fueron incubadas con el DCFH a una concentración final de 10 µM durante 30 minutos a 37°C y en oscuridad.
- La Dihidrorodamina 123 (DhRd123, Sigma), difunde pasivamente a través de la mayoría de las membranas celulares y presenta afinidad por la mitocondrias donde es oxidada a rodamina 123. En cambio con este fluoróforo obtendremos la información de los ROS mitocondriales presentes en las células. Las células fueron incubadas con DhRd123 a una concentración final de 10 µM durante 30 minutos a 37°C y en oscuridad.
- Para la determinación del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) mitocondrial se utilizó el fluoróforo MitoSOX™ Red (Molecular Probes, *Invitrogen*) a una concentración final de 5 µM en

*Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) sin calcio y sin magnesio (Gibco) y se incubó durante 30 minutos a 37°C en oscuridad.

Al terminar los tiempos de incubación, las células fueron despegadas de la placa con Tripsina al 2% y tras una centrifugación, las células se resuspendieron en 400 µL de suero salino y se pasaron por el citómetro de flujo FacsCalibur (*Beckton Dickinson*).

La fluorescencia se midió en 10.000 células en el citómetro con excitación a 480 nm y analizando la intensidad de fluorescencia a 520 nm en el canal FL-1 en el caso del DCFH-DA y de la DhRd123. Para el otro fluoróforo seleccionado, la excitación fue a 510 nm y analizando la intensidad de fluorescencia a 580 nm en el canal FL-2. La intensidad de la fluorescencia observada se puede correlacionar con el contenido celular de radicales libres.

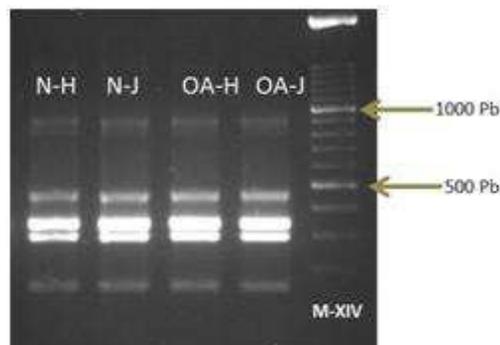
### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico entre los grupos creados en cada apartado del presente estudio se llevó a cabo con el T-test utilizando el Graph Pad Prism versión 5.01 (San Diego, California, USA). Los resultados se representaron como una media de al menos tres medidas y una desviación estándar ( $\pm$  SD). Los valores de  $p \leq$  de 0,05 (\*) y 0,005 (\*\*) fueron considerados como significativos.

## IV. RESULTADOS

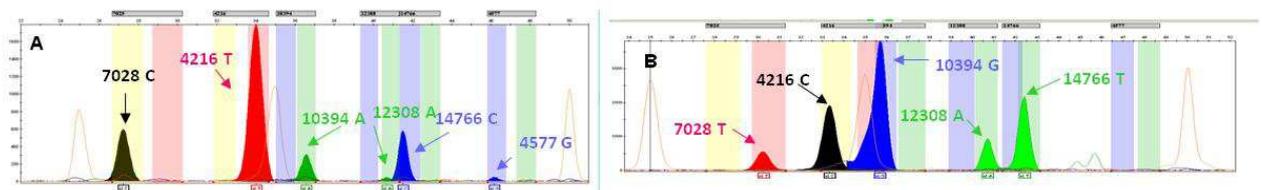
Una vez generados los cíbridos trasmitocondriales portadores de los haplogrupos H y J de individuos sanos (N) y artrósicos (OA) y estabilizado el número de copias de ADNmt (trabajo realizado previamente tanto por el grupo de genómica como por el de cultivos celulares del INIBIC), los cíbridos estaban ya disponibles para su posterior caracterización que es en lo que se centra el presente trabajo.

Antes de iniciar la caracterización de los cíbridos fueron haplogrupados, para comprobar si realmente eran portadores del haplogrupo deseado. Para esto, se realizó una PCR *multiplex* (Figura 5) para poder desarrollar una secuenciación de los SNPs que definen ambos haplogrupos.



**Figura 5.** Gel de agarosa al 1,5% resultado de la PCR multiplex realizada con los ADN de los cíbridos, donde pueden apreciarse los seis fragmentos que contienen los SNPs característicos de los haplogrupos mayoritarios en Europa.

El análisis de los cromatogramas generados puso de manifiesto que los cíbridos eran portadores del haplogrupo H (Figura 6A) y del J (Figura 6B).

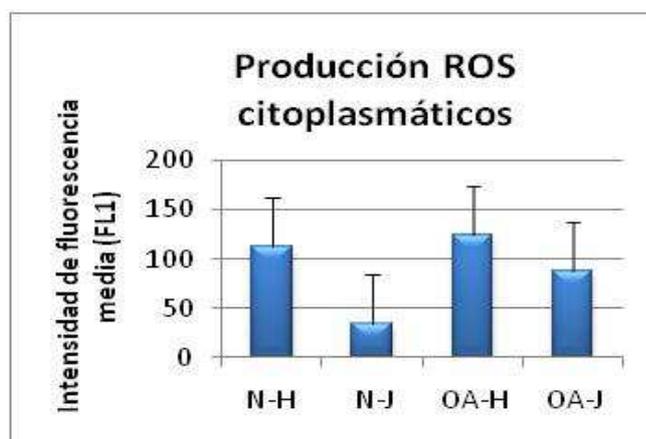


**Figura 6.** Cromatogramas del SBE obtenidos mediante secuenciación. **A:** cromatograma correspondiente al haplogrupo H, definido por una citosina (C) en la posición 7025. **B:** Cromatograma correspondiente al haplogrupo J, definido por una C en la posición 4216, una guanina (G) en la 10394 y una adenina (A) en la 12308.

Una vez confirmado que los cíbridos que se iban a utilizar como material de trabajo para el presente estudio eran portadores de los haplogrupos H y J, se llevaron a cabo los experimentos tanto para determinar los niveles de producción de ROS como para analizar los niveles de expresión de los genes de interés citados anteriormente.

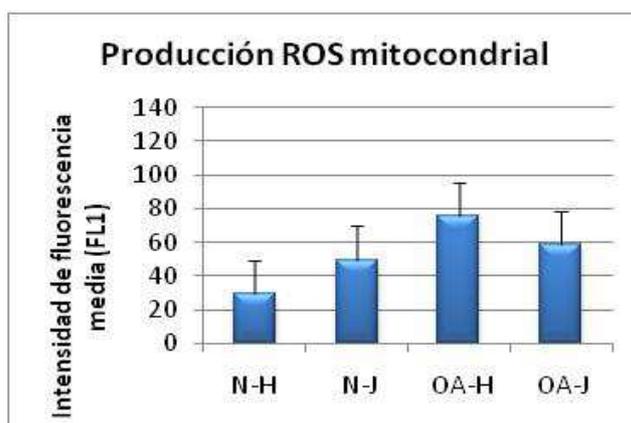
El análisis de los niveles de producción de ROS tanto a nivel citoplasmático como mitocondrial se llevaron cabo con el valor de la mediana de la fluorescencia total y en las gráficas se representan los valores de la media±desviación estándar (SD). En todos los casos para representar los valores se les sustrajo el nivel de fluorescencia basal emitido por cada híbrido.

El análisis de la producción de ROS citoplasmáticos medidos con DCFH-DA, reflejó que el híbrido OA-H presentó el valor más elevado ( $123,66\pm 101,06$ ), seguido del N-H ( $112,59\pm 81,83$ ), del OA-J ( $87,915\pm 66,97$ ) y el que presentó el menor nivel de producción de ROS fue el N-J ( $33,84\pm 23,77$ ) (Figura 7).



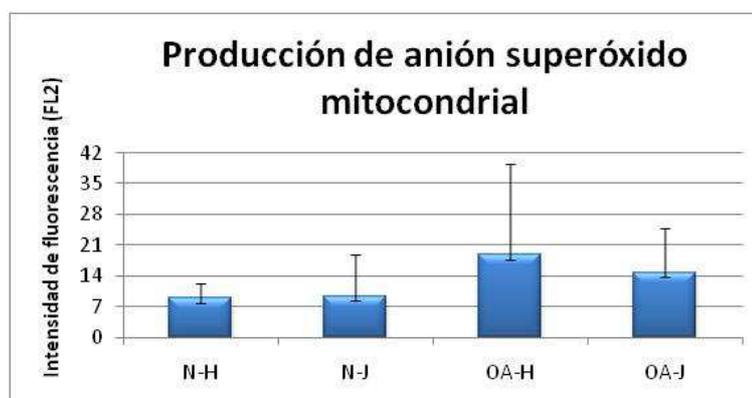
**Figura 7.** Intensidad de fluorescencia media (FL1) relativa a los niveles de producción de ROS citoplasmáticos analizados mediante DCFH-DA, datos obtenidos tras tres experimentos independientes. Representadas la media y la desviación estándar de los cuatro híbridos analizados.

En cuanto al nivel de producción de ROS mitocondriales analizados con DhRd123, fue el OA-H el que presentó unos niveles de producción más elevados ( $75,69\pm 59,75$ ) de los cuatro híbridos analizados; por su parte el OA-J reflejó unos niveles de ROS más bajos que el otro híbrido OA analizado ( $58,42\pm 42,59$ ). En este caso fueron los híbridos N los que presentaron unos niveles menores de producción de ROS mitocondrial ( $29,58\pm 21,77$  para el N-H y  $49,75\pm 20,68$  para el N-J) (Figura 8).



**Figura 8.** Intensidad de fluorescencia media (FL1) relativa a los niveles de producción de ROS mitocondriales analizados con DhRd123, datos obtenidos tras tres experimentos independientes. Representadas la media y la desviación estándar de los cuatro cíbridos analizados.

Los niveles de producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) mitocondrial fueron analizados mediante MitoSox®. El análisis de los valores de intensidad de la fluorescencia, después de sustraer el nivel basal, reflejó que el OA-H ( $18,8 \pm 20,81$ ) presentaba los valores más altos de producción en comparación con los otros 3 cíbridos (N-H  $8,956 \pm 3,34$ , N-J  $9,34 \pm 4,64$  y OA-J  $14,79 \pm 7,13$ ) (Figura 9).

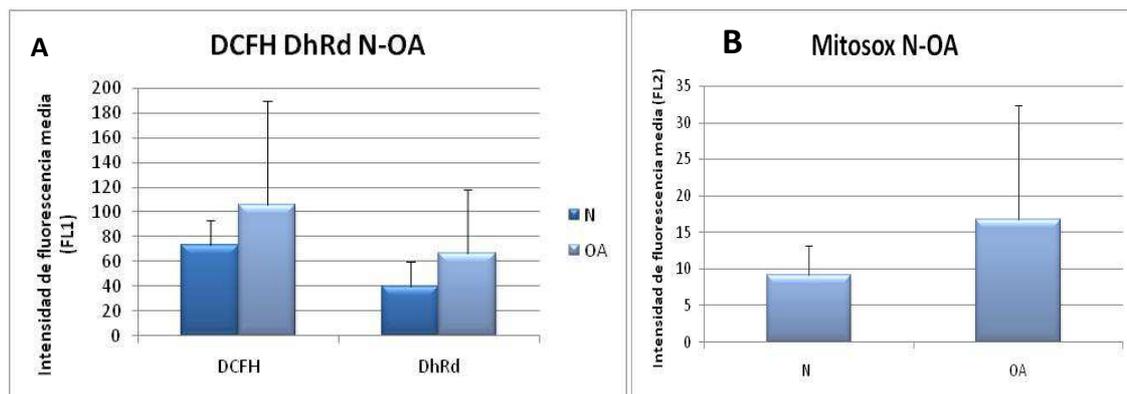


**Figura 9.** Intensidad de fluorescencia media (FL2) relativa a los niveles de producción del anión superóxido mitocondrial medido con MitoSox®. Datos obtenidos tras tres experimentos independientes. Representadas la media y la desviación estándar de los 4 cíbridos analizados.

Dado que todos los análisis realizados hasta el momento pusieron de manifiesto que los cíbridos N y OA muestran un comportamiento diferente así como los portadores de los diferentes haplogrupos. Realizamos los mismos análisis descritos anteriormente, pero agrupando los cíbridos primero en N y OA y después en función de si eran portadores del haplogrupo H o del J.

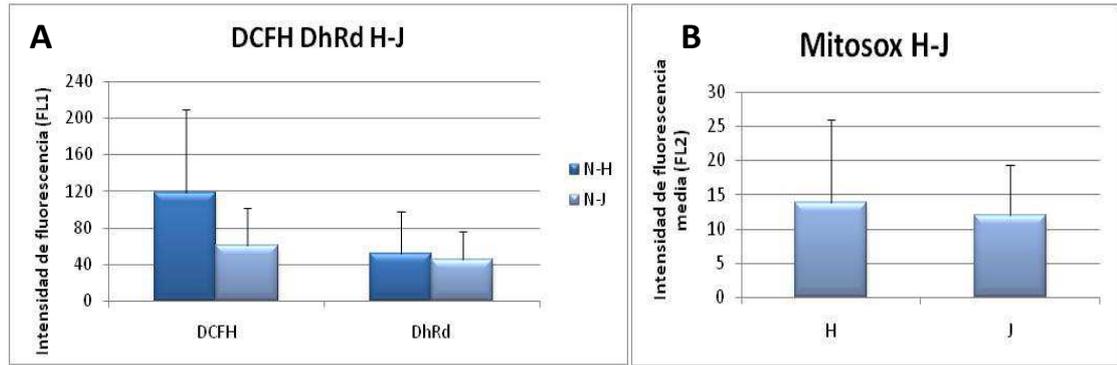
Al agrupar los cíbridos en función de si las mitocondrias provenían de un paciente sano (N) o artrósico (OA) se puso de manifiesto, de una manera más clara, las diferencias existentes en cuanto a la producción de ROS. En cuanto a la producción de ROS totales los OA

(105,79±73,8) producen más que los N (73,21±42,3). Mientras que el caso de los ROS mitocondriales los OA (67,06±40,43) casi producen el doble que los N (39,665±20,8) (Figura 10A). Los niveles de producción del  $O_2^-$  al agrupar las muestras en N y OA reflejó que los N (9,15±4,01) producen casi la mitad de este radical que los OA (16,79±15,47) (Figura 10 B). Todos estos datos parecen indicar, pese a la dispersión de los datos, que los híbridos generados a partir de plaquetas de donantes artrósicos (OA) presentan una mayor producción de ROS, tanto citoplasmáticos como mitocondriales.



**Figura 10.** A Intensidad de fluorescencia media (FL1) relativa a los niveles de producción de los ROS citoplasmáticos y mitocondriales analizados con DCFH y DhRd123. B Intensidad de fluorescencia media (FL2) relativa a los niveles de producción de  $O_2^-$  mitocondrial Datos obtenidos agrupando los N y OA. 3 experimentos independientes y representadas la media y la desviación estándar.

Al agrupar los híbridos por haplogrupo observamos que las diferencias entre ambos son claras, tanto a nivel de ROS citoplasmáticos como mitocondriales. En el caso de los ROS citoplasmáticos, los híbridos portadores del haplogrupo H (118±91,44) casi producen el doble que los portadores del J (60,86±39,82) (Figura 11A). La producción de ROS mitocondriales también fue mayor en los H (52,36±40,16) que en los J (44,9±22,535), aunque las diferencias no son tan notables como en el caso de la producción de ROS citoplasmáticos (Figura 11A). Los niveles de producción del  $O_2^-$  al agrupar de esta manera las muestras, reflejaron también un mayor valor en los H (13,87±12,08) frente a los J (12,065±7,389). Todos estos datos, a pesar de su dispersión, parecen indicar que los haplogrupos H presentan una mayor producción de ROS.

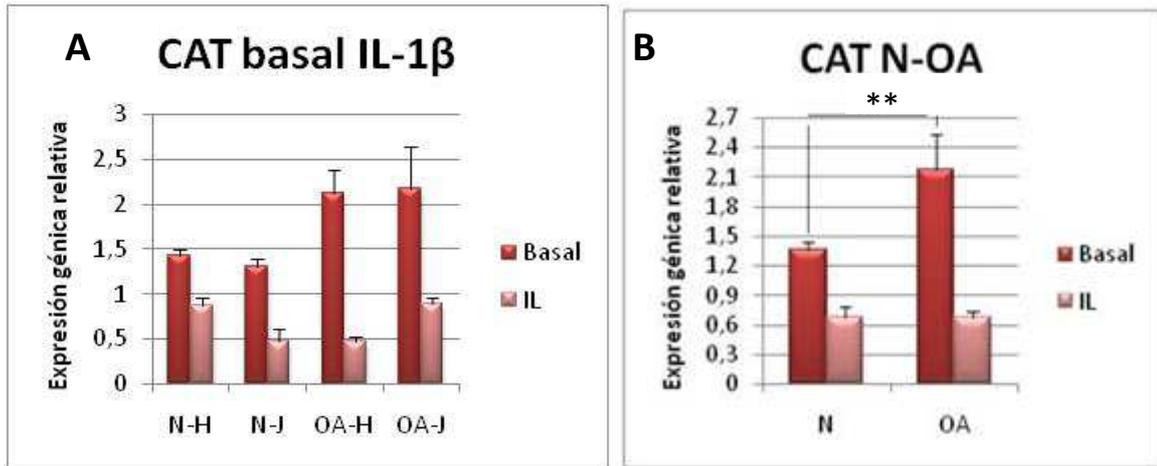


**Figura 11. A** Intensidad de fluorescencia media (FL1) relativa a los niveles de producción de los ROS citoplasmáticos y mitocondriales analizados con DCFH y DhRd123. **B** Intensidad de fluorescencia media (FL2) relativa a los niveles de producción de  $O_2^-$  mitocondrial Datos obtenidos agrupando los H y J. 3 experimentos independientes y representadas la media y la desviación estándar.

### Expresión de genes

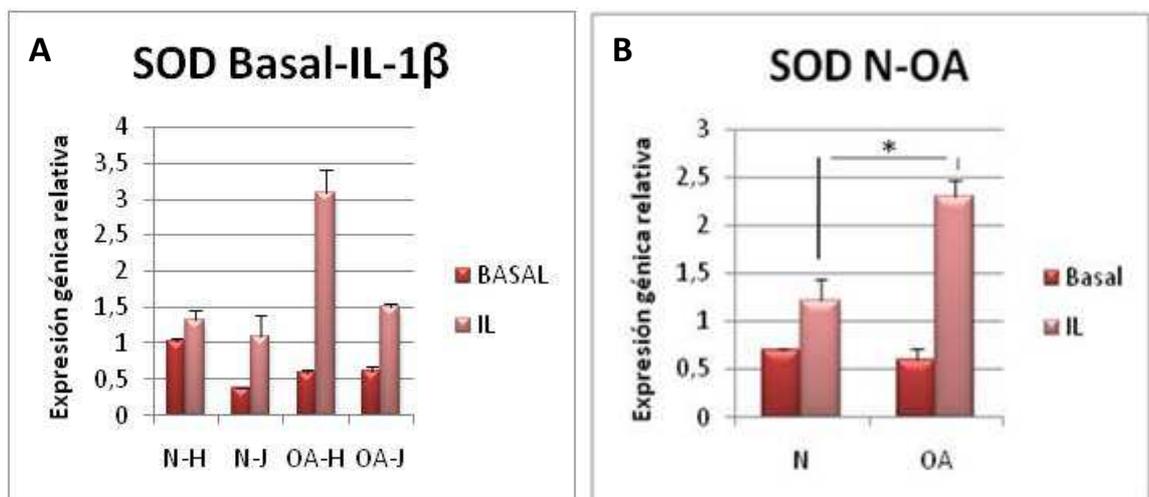
Ya que el objetivo de este trabajo es evaluar el papel de los niveles de producción de ROS en la artrosis utilizando para ello híbridos portadores de dos haplogrupos diferentes, y con los datos descritos anteriormente donde se puso de manifiesto que existen diferencias de producción de ROS en las cuatro variantes estudiadas, el siguiente paso fue analizar los niveles de expresión de enzimas encargadas la detoxificación de los mimos. Para lo cual analizamos los niveles de expresión de la CAT y de SOD en los híbridos tanto en condiciones basales como estimulados con IL-1 $\beta$ .

El análisis de la expresión de CAT tanto en condición basal como estimulada con IL-1 $\beta$ , no presentó diferencias significativas entre los normales H (basal  $1,41 \pm 0,07$ , IL-1 $\beta$   $0,86 \pm 0,08$ ) y N-J (basal  $1,31 \pm 0,07$ , IL-1 $\beta$   $0,48 \pm 0,13$ ) ni tampoco entre los OA-H (basal  $2,12 \pm 0,2572$ , IL-1 $\beta$   $0,468 \pm 0,06$ ) y OA-J (basal  $2,1726 \pm 0,4744$ , IL-1 $\beta$   $0,8854 \pm 0,0789$ ) (Figura 12A). Al igual que en los caso anteriores se apreció la existencia de diferencias entre los híbridos N y OA por lo que se agrupan y analizaron, reflejando una mayor expresión de la catalasa en los híbridos OA ( $2,17 \pm 0,36$ ) frente a los N ( $1,364 \pm 0,0767$ ) en estado basal (\*\*  $p < 0,005$ ) (Figura 12B).



**Figura 12. A:** Expresión génica relativa de la catalasa en los cuatro cíbridos analizados. Datos obtenidos tras una PCR a tiempo real utilizando como gen de referencia RPLP13A y representando la media con la desviación estándar de cada uno. **B:** comparación de la expresión de CAT entre los cíbridos N y OA y representando la media y la desviación estándar de cada uno (\*\*  $p < 0,005$ ).

Por otro, los niveles de expresión de la enzima detoxificadora SOD en estado basal, reflejaron en los N-H ( $1,03 \pm 0,03$ ) una mayor expresión que los N-J ( $0,37 \pm 0,01$ ) y que ambos OA (OA-H  $0,59 \pm 0,05$  y OA-J  $0,616 \pm 0,06$ ). Mientras que al estimular las células con IL-1 $\beta$  durante 48 horas, los niveles de expresión de SOD aumentaron más en los cíbridos OA (OA-H  $3,09 \pm 0,3120$  y OA-J  $1,57 \pm 0,04$ ) que en los N (N-H  $1,32 \pm 0,15$  y N-J  $1,09 \pm 0,29$ ) (Figura 13A). Agrupando los cíbridos por N y OA pudimos observar que los OA estimulados con IL-1 $\beta$ , presentan unos niveles de expresión estadísticamente significativamente (\*  $p < 0,05$ ) mayores que los N (OA  $2,09 \pm 0,301$ ; N  $1,21 \pm 0,2183$ ) (Figura 13B).



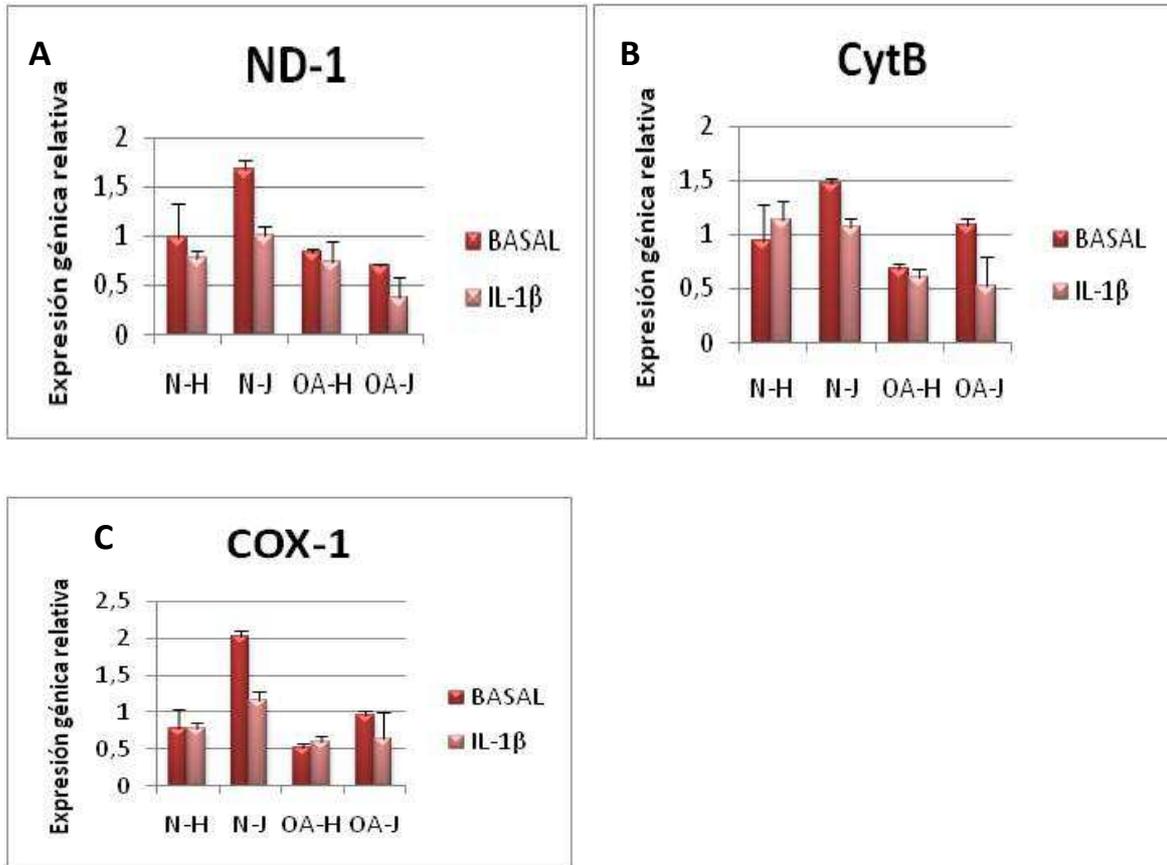
**Figura 13. A:** Expresión génica relativa de la superóxido dismutasa en los 4 cíbridos analizados. Datos obtenidos tras una PCR a tiempo real utilizando como gen de referencia RPLP13A y representando la media y la desviación estándar. **B:** Comparación en la expresión de SOD entre N y OA estimulados con IL-1 $\beta$  y representando la media y la desviación estándar de cada uno (\*  $p < 0,05$ ).

Los niveles de expresión de los tres genes mitocondriales analizados, reflejaron que estos genes no se ven modulados por el tratamiento con IL-1 $\beta$ . El análisis mostró para todos los genes que el híbrido N-J presentaban los niveles de expresión más altos al compararlo con los demás.

Los niveles de expresión del gen ND-1 reflejaron que el nivel de N-J es de  $1,66 \pm 0,11$  en estado basal y  $0,73 \pm 0,22$  con IL-1 $\beta$  frente a los valores de N-H ( $0,99 \pm 0,34$  en estado basal y  $0,77 \pm 0,08$  con IL-1 $\beta$ ), OA-H ( $0,83 \pm 0,04$  en estado basal y  $0,73 \pm 0,22$  con IL-1 $\beta$ ) y OA-J ( $0,69 \pm 0,03$  en estado basal y  $0,38 \pm 0,2$  con IL-1 $\beta$ ) (Figura 14A).

En el caso de la expresión del CytB, el análisis puso de manifiesto que la expresión del híbrido N-J es también mayor ( $1,47 \pm 0,94$  en estado basal y  $1,06 \pm 0,09$  con IL-1 $\beta$ ) frente a los valores de N-H ( $0,94 \pm 0,33$  en estado basal y  $1,15 \pm 0,19$  con IL-1 $\beta$ ), OA-H ( $0,69 \pm 0,03$  en estado basal y  $0,61 \pm 0,08$  con IL-1 $\beta$ ) y OA-J ( $1,08 \pm 0,06$  en estado basal y  $0,52 \pm 0,28$  con IL-1 $\beta$ ) (Figura 14B).

El análisis de los niveles de expresión del gen COX-1 mostró que el valor de N-J es de  $2,01 \pm 0,08$  en estado basal, más del doble de la expresión que presentan los otros híbridos estudiados en el presente trabajo, mientras que con IL-1 $\beta$  es de  $1,15 \pm 0,22$ . El resto de los híbridos mostraron niveles de expresión de COX-1 bastante similares (N-H ( $0,76 \pm 0,28$  en estado basal y  $0,7759 \pm 0,07$  tras 48 horas de estimulación con IL-1 $\beta$ ), OA-H ( $0,52 \pm 0,06$  en estado basal y  $0,5963 \pm 0,0798$  con IL-1 $\beta$ ) y OA-J ( $0,96 \pm 0,05$  en estado basal y  $0,63 \pm 0,35$  con IL-1 $\beta$ ) (Figura 14C).



**Figura 14.** Niveles de expresión génica relativa de los tres genes mitocondriales en los cuatro híbridos analizados. **A.** NADH deshidrogenasa subunidad-1 (ND-1). **B.** Citocromo B (CytB). **C:** Citocromo c oxidasa subunidad- 1 (COX-1). Datos obtenidos tras una PCR a tiempo real utilizando como gen de referencia ARNr18S y representando las medias y desviaciones estándar de cada uno.

## V. DISCUSIÓN

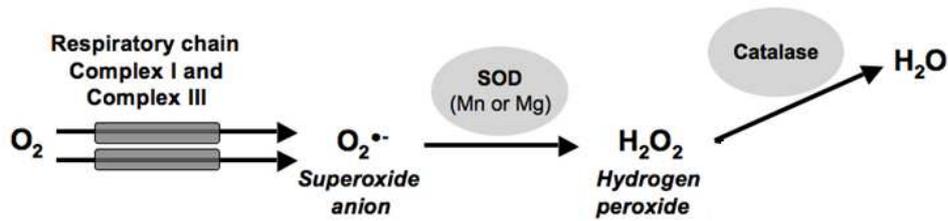
El empleo de cíbridos trasmitocondriales como herramienta para analizar el papel de las mutaciones del ADNmt en diversas patologías está ampliamente aceptado (Swerdlow, 2007; Malik *et al.*, 2014) por eso nos hemos planteado el uso de esta metodología para evaluar el papel de la mitocondria en el proceso artrósico y poder así reproducir lo descrito previamente del papel de la mitocondria en el proceso artrósico, en un modelo celular.

En este estudio se seleccionaron cíbridos portadores de los haplogrupos H y J, ya que como se describió previamente, se conoce que ambos haplogrupos presentan una diferente asociación con la patología, de manera que los portadores del haplogrupo J presentan un menor riesgo de desarrollar artrosis y si la desarrollan esta tendrá una evolución menor que los individuos portadores del haplogrupo H (Rego-Pérez *et al.*, 2008; 2010). También partimos del conocimiento previo de que los haplogrupos de ADNmt modulan la respuesta al estrés oxidativo mediado por la producción de radicales libres de oxígeno. Diversos autores describieron que el haplogrupo J se define por un grupo de mutaciones puntuales en el ADNmt, que de alguna manera pueden ayudar a un mayor desacoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, haciendo por tanto que esta las células presenten una menor producción de ROS (Rego-Pérez *et al.*, 2008; 2010; Gaweda *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en los análisis de producción de ROS ponen de manifiesto que de los cíbridos analizados, el que mayor nivel de producción de ROS (citoplasmáticos, mitocondriales y de anión superóxido mitocondrial) mostró fue el OA-H

Pese a que estos resultados son preliminares, ya que se llevaron a cabo en un único cíbrido por haplogrupo y únicamente se analizó un clon, los resultados parecen apoyar los estudios previos descritos previamente, donde el haplogrupo H presenta un mayor nivel de estrés oxidativo por lo que si estos individuos desarrollan OA esta será más severa o presentaran una mayor progresión. Así los condrocitos artrósicos y además portadores del haplogrupo H, presenten ya de base una función mitocondrial menos eficiente en el entorno del cartílago articular, lo cual facilitaría la progresión de la patología.

Ya que se detectó una diferencia en los niveles de producción de ROS y que estos parecen jugar un papel en el desarrollo de la patología, se analizaron los niveles de expresión de dos enzimas detoxificadoras CAT y SOD. Ambas enzimas están implicadas en la detoxificación de ROS producidos a nivel mitocondrial. La enzima superóxido mitocondrial (SOD) cataliza la dismutación del anión superóxido en oxígeno (O<sub>2</sub>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que a su vez es eliminado por la catalasa (CAT) (Figura 15).



**Figura 15.** Sistema antioxidante natural en el que SOD cataliza la destrucción del radical anión superóxido, formando peróxido de hidrógeno. La catalasa lo neutraliza transformándolo en agua.

Los resultados obtenidos reflejaron una mayor expresión de SOD en OA frente a los normales, cuando estos son estimulados con  $IL-1\beta$ , lo cual concuerda con los datos obtenidos previamente de los niveles de séricos de esta enzima (Fernández-Moreno *et al.*, 2011) y este aumento en pacientes OA indica un aumento del estrés oxidativo en estos pacientes, datos en línea con los obtenidos previamente en este trabajo. Del mismo modo los niveles de CAT obtenidos, reflejaron una mayor expresión en los individuos portadores OA, dato en sintonía con los niveles séricos descritos de esta enzima (Fernández-Moreno *et al.*, 2011).

Dentro del presente trabajo y ya que los SNPs que definen los haplogrupos H y J se localizan en diferentes subunidades de la cadena de transporte electrónico, y que son los complejos I y III los que tienen una mayor importancia a la hora de aumentar los niveles de ROS en la mitocondria. Analizamos la expresión de tres genes; ND-1 (integrante del complejo-I), Cyt-b (integrante del complejo-III) y Cox-I (integrante del complejo-IV). Los niveles de expresión de los tres genes no mostraron grandes diferencias siendo quizás un poco más elevado en los híbridos N-J, lo cual se puede relacionar con un mejor funcionamiento de la mitocondria.

## VI. CONCLUSIONES

El análisis de los datos obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Primera, la producción de ROS muestra diferencias entre todos los híbridos. Teniendo esto en cuenta, decidimos agrupar las muestras en dos grupos independientes. Uno de estos grupos incluye los híbridos normales y los OA y reflejó que los híbridos OA tienen una mayor producción de ROS. El segundo grupo creado en función del haplogrupo (H y J) y su análisis reflejó que los híbridos J presentaban el menor estrés oxidativo.
2. Los niveles de expresión génica relativa, de las enzimas detoxificadoras CAT y SOD, mostraron un aumento en híbridos OA. En el caso de CAT, la diferencia se observó en las condiciones basales, los niveles en los OA fueron mayores que en los N ( $p \leq 0,005$ ), IL-1 $\beta$  no modula sus niveles. SOD fue estimulada por la incubación de las células con IL-1 $\beta$ , y los OA mostraron dos veces más producción de SOD que los N ( $p \leq 0,05$ ).
3. El análisis de la expresión génica de los genes mitocondriales (ND-1, CytB y COX-1) mostró que el híbrido N-J presentaba una mayor expresión que el resto de híbridos analizados.

Estos datos sugieren que los artrósicos presentan alteraciones en la función mitocondrial mediadas por ROS, deficiencias energéticas y reducción en la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico.

Por otro lado, es importante poner de manifiesto el papel de los híbridos como modelo celular a la hora de entender el papel de la mitocondria en diferentes patologías degenerativas y en el desarrollo de futuras terapias.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Blanco FJ, Lopez-Armada MJ, Maneiro E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion*. Netherlands. 2004; 715-728.
- Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011; 7:161-169
- Cillero-Pastor B, Carames B, Lires-Dean M, Vaamonde-Garcia C, Blanco FJ, Lopez-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(8):2409-2419.
- Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Pertega S, Oreir N, Fernandez-Lopez C, Rego-Perez I, Blanco FJ. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and serum levels of anti-oxidant enzymes in patients with osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2011; 12:264.
- Gallardo ME, García-Pavía P, Chamorro R, Vázquez ME, Gómez-Bueno M, Millán I, Almoguera B, Domingo V, Segovia J, Vilches C, Alonso-Pulpón L, Garesse R, Bornstein B. Mitochondrial haplogroups associated with end-stage heart failure and coronary allograft vasculopathy in heart transplant patients. *Eur Heart J*. 2011.
- Gaweda-Walerych K, Maruszak A, Safranow K, Bialecka M, Klodoruska-Duda G, Czyzewski K, Slawed J, Rudzinska M, Styczynska M, Opala G, Drozdik M, Canter JA, Barcikowska M, Zekanowski C. Mitochondrial DNA haplogroups and suhaplogroups are associated with Parkinson's disease risk in a Polish PD cohort. *J Neural Transm*. 2008; 115:1521-1526.
- Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009; 17(1):107-113.
- Henrotin Y, Kurz B. Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality? *Curr Drug Targets*. 2007; 8(2):347-357.
- Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets*. 2007; 8(2):333-345.
- López AM, Martínez-Redondo D, Dahmani Y, Casajús JA, Ruíz-Pesini E, Montoya J, López-Pérez MJ, Díez-Sánchez C. Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion*. 2009; 9(1):27-30.
- Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, Brandon M, Easley K, Chen E, Brown MD, Sukernik RI, Olckers A, Wallace DC. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 171-176.
- Rego I, Fernández- Moreno M, Relaño S, Arenas J, Blanco FJ. The use of Single Base Extension (SBE) for the assessment of European mitochondrial DNA haplogroups in Galician population. *The Open Cell Development & Biology Journal*. 2007;1:9-15.
- Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Lopez C, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008; 58(8):2387-2396.
- Rego I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Gómez-Reino JJ, González A, Arenas J, Blanco FJ. Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69(1):210-213.

- Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Díaz M, Urriés A, Montoro L, López-Pérez MJ, Enríquez JA. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet.* 2000; 67(3):682-696.
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science.* 2004; 303(5655):223-226.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowski R, Leiber M, Gassman M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology.* 2006; 7:3.
- Swerdlow RH. Review Mitochondria in Cybrids Containing mtDNA From Persons With Mitochondriopathies. *Journal of Neuroscience Research.* 2007; 85:3416–3428.
- Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics.* 1996; 144(4):1835-1850.
- Van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, Pericak-Vance MA, Vance JM. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2003; 72(4):804-811.