



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

**MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA
ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Curso académico 2015-2016

TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

**Estudio de las variantes genéticas
mitocondriales en el sistema de
detoxificación celular. Papel en la artrosis.**

Lidia Hermida Nogueira

27 de Junio de 2016

Relación de directores:

Dr. Ignacio Rego Pérez

Dr. Francisco Blanco

ÍNDICE

Resumen	1
Resumo	2
Abstract.....	3
1. Introducción.....	4
1.1 Artrosis. Definición, etiología e impacto social.....	4
1.2 La genética en la artrosis.....	7
1.3 La mitocondria en la artrosis. Haplogrupos mitocondriales.	7
1.4 Especies reactivas de oxígeno. Estrés oxidativo y su influencia en el desarrollo de la artrosis.	9
1.5 Justificación de los polimorfismos propuestos y breve descripción de cada uno.....	11
1.5.1 Superóxido dismutasa.....	11
1.5.2 Glutación peroxidasa (GPX).....	13
2. Objetivo	14
3. Metodología.....	15
3.1 Obtención de las muestras	15
3.2 Extracción de ADN	15
3.3 Asignación de los haplogrupos mitocondriales.....	16
3.3.1 Amplificación mediante PCR.....	16
3.3.2 Purificación de los productos de PCR	17

3.3.3 Ensayo SBE	17
3.3.4 Purificación de los productos de SBE.....	18
3.3.5 Identificación de los polimorfismos	18
3.4 Identificación de los SNPs	18
3.5 Análisis estadístico	21
4. Resultados	22
4.1 Estudio de replicación.....	24
4.2 Estudio de asociación de genotipos nucleares.....	24
4.3 Estudio de las interacciones entre los clusters mitocondriales y los genotipos nucleares.....	25
5. Discusión.....	29
6. Conclusiones.....	33
7. Bibliografía referenciada.....	34

Resumen

Objetivo: Investigar las interacciones entre los haplogrupos mitocondriales y diferentes polimorfismos de genes que intervienen en la detoxificación celular en la prevalencia de la artrosis de cadera.

Metodología: Se asignaron los haplogrupos mitocondriales en una cohorte de 233 pacientes con artrosis de cadera y 117 controles sanos mediante la técnica de *Single Base Extension* (SBE). Esta misma técnica también se empleó para identificar los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) rs4880 y rs1050450 de los genes SOD2 y GPX1 respectivamente. Los datos se analizaron con el software SPSS v19 siguiendo una metodología estadística que incluyó tablas de contingencia con test chi-cuadrado y modelos de regresión logística ajustando por sexo y edad.

Resultados: Se confirmó la asociación del cluster TJ como factor protector de artrosis al aparecer significativamente más representado en los controles sanos (OR=0.513; IC 95%=0.475-0.931; p=0.028). Ninguno de los dos SNPs por separado mostró una asociación significativa con el riesgo de padecer la enfermedad; sin embargo, la interacción del cluster TJ con el genotipo CC del polimorfismo rs1050450 del gen GPX1 se reveló como un factor de protección aditivo frente al desarrollo de la artrosis (OR=0.258; IC 95%=0.096-0.694; p=0.007). El análisis del polimorfismo rs4880 del gen SOD2 reveló una tendencia que bordeó la significación estadística a nivel de la interacción del genotipo CC/CT con los portadores del cluster noTJ con un mayor riesgo de artrosis (OR=3.228; IC 95%=0.818-12.743; p=0.094).

Conclusiones: Las interacciones entre los haplogrupos mitocondriales y diferentes SNPs nucleares relacionados con la detoxificación celular parecen inducir un efecto aditivo en su asociación con el desarrollo de la artrosis.

Resumo

Obxectivo: Investigar si o efecto dos haplogrupos mitocondriais na prevalencia da artrose de cadeira tamén se relaciona con polimorfismos de xenes que interveñen na detoxificación celular.

Metodoloxía: Asignáronse os haplogrupos mitocondriais nunha cohorte de 233 doentes con artrose de cadeira e 117 controis sanos mediante a técnica de Single Base Extension (SBE). Esta mesma técnica tamén empregouse para identificar os polimorfismos dun só nucleótido (SNPs) rs4880 e rs1050450 dos xenes SOD2 y GPX1 respectivamente. Os datos analizáronse co software SPSS v19 seguindo unha metodoloxía estadística que incluiu táboas de continxencia co test chi-cadrado e modelos de regresión loxística axustando por sexo e idade.

Resultados: Confirmouse a asociación do cluster TJ como factor protector da artrose ó aparecer significativamente máis representado nos controis sanos (OR=0.513; IC 95% (0.475-0.931); $p=0.028$). Ningún dos dous SNPs por separado amosou asociación significativa con risco de padecer a enfermidade; sen embargo, a interacción do cluster TJ co xenotipo CC do polimorfismo rs1050450 do xen GPX1 revelouse como un factor protector aditivo fronte ó desenvolvemento da artrose (OR=0.258; IC 95% (0.096-0.694); $p=0.007$). O análise do polimorfismo rs4880 do xen SOD2 revelou unha tendencia que bordeou a significación estadística a nivel da interacción do xenotipo CC/CT cos portadores do cluster nonTJ cun maior risco de artrose (OR=3.228; IC 95% (0.818-12.743); $p=0.094$).

Conclusións: As interaccións entre os haplogrupos mitocondriais e diferentes SNPs nucleares relacionados coa detoxificación celular semellan un efecto aditivo na súa asociación co desenvolvemento da artrose.

Abstract

Objective: To investigate potential interactions between mitochondrial haplogroups and polymorphisms in genes involved in the cellular detoxification in the prevalence of hip osteoarthritis (OA).

Methodology: We assigned the mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups in a cohort of 233 patients with hip OA and 117 healthy controls using the Single Base Extension (SBE) assay. SBE was also used to identify the single nucleotide polymorphism rs4880 and rs1050450 in SOD2 and GPX1 genes, respectively. Data were analyzed with SPSS software (v19) following appropriate approaches that included chi-square contingency tables and logistic regression models adjusting by gender and age.

Results: Our results confirmed the mitochondrial cluster TJ as a protective factor in OA (OR=0.513; 95% CI (0.475-0.931); p=0.028). Individuals harboring any of the 2 analyzed SNPs did not show a significant increased risk of OA, nevertheless the interaction between mitochondrial cluster TJ and the CC genotype of GPX1 gene showed an additive protective effect against the development of OA (OR=0.258; 95% CI=0.096-0.694; p=0.007).

Conclusions: Interactions between mitochondrial haplogroups and different nuclear SNPs in detoxification genes, specifically the GPX1 gene, show an additive protective effect against the development of OA.

1. Introducción

1.1 Artrosis. Definición, etiología e impacto social.

La artrosis es una enfermedad asociada con dolor y pérdida de función en numerosas articulaciones del cuerpo además de ser la patología reumática más común. Compromete cartílago, hueso, membrana sinovial y la cápsula articular siendo el cartílago el tejido más afectado. Las propiedades biomecánicas tan especiales del cartílago dependen de la matriz extracelular, cuyos principales componentes son agua (60% a 80% del peso tisular), colágenos (10% - 30%) y proteoglicanos (5% - 10%).

Del colágeno que compone la matriz del cartílago, el 90% es del tipo II y se dispone en forma de una red tridimensional de fibras dando la forma, volumen y la fuerza al cartílago. El otro 10% está constituido por colágenos tipos VI, IX, X y XI.

Los proteoglicanos son agregados hidrofílicos altamente cargados que se encuentran embebidos en el interior de la red de colágeno, creando presión por retención de agua, la cual es comprimida por la propia red de fibras de colágeno. Esta organización confiere al tejido articular una estructura con la propiedad de revertir la deformación. El principal proteoglicano del cartílago es el agregano, un cordón de proteína al cual se le unen cadenas de otras proteínas, como el condroitín sulfato y el keratán sulfato, y cuya parte terminal se une al ácido hialurónico (Figura 1). En el cartílago se encuentran además otros tipos de proteoglicanos como el dermatán sulfato, que es importante para mantener la integridad del cartílago (1).

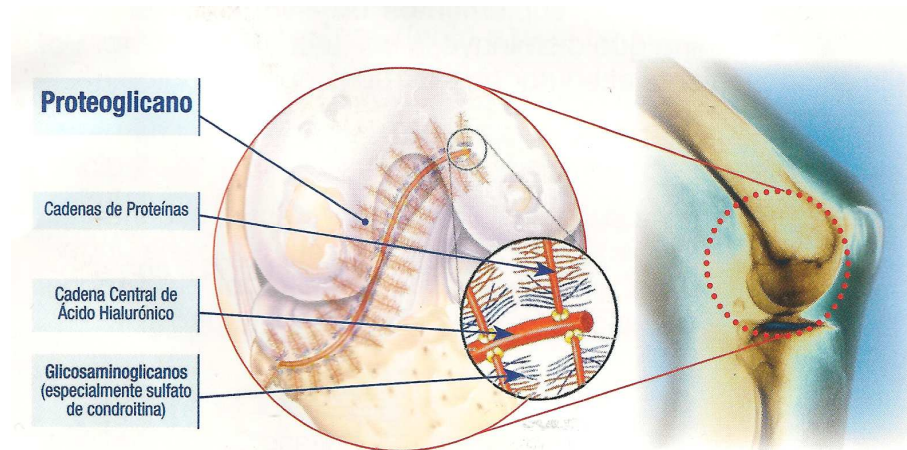


Figura 1. Componentes del cartílago articular (2). Cadena de ácido hialurónico a la que se anclan los proteoglicanos y glicosaminoglicanos.

Este tejido es único ya que no posee inervación, vasos sanguíneos, linfáticos ni membrana basal. Las células del cartílago, los condrocitos, se nutren por difusión desde el hueso subcondral a través del fluido sinovial, siendo los responsables del mantenimiento y síntesis de la matriz extracelular. Estas células presentan receptores para numerosas citoquinas respondiendo a estímulos químicos y a estímulos mecánicos.

Según los datos de la Sociedad Española de Reumatología, la artrosis es la enfermedad articular más frecuente en España. Se estima que afecta al 43% de la población y alrededor de la mitad de la población adulta de más de 50 años muestra signos radiológicos de artrosis de rodilla aunque es más frecuente en mujeres, sobre todo a partir de 55 años. En 2007 los costes anuales totales fueron de 1.502 euros por paciente, en su mayoría debido a los costes directos, mientras que el costo nacional fue de aproximadamente 4.738 millones de euros, lo que representa un 0.5% del PIB (3).

El diagnóstico de la artrosis se basa con frecuencia en los informes de pacientes de dolor y rigidez y, mediante una radiografía, el médico puede distinguir la presencia de osteofitos, el pinzamiento del cartílago, las geodas subcondrales y el estrechamiento del espacio articular, síntomas claros de la artrosis que no siempre se correlacionan con la gravedad de la enfermedad o disfunción de la articulación y puede ser confundida por

otros factores (4). Otras pruebas que se pueden utilizar en casos excepcionales son la tomografía computarizada (TC) y la resonancia o la ecografía de alta resolución de manera complementaria para reafirmar el diagnóstico.

El diagnóstico se hace en base a los criterios de la *American College of Rheumatology* (ACR) y la escala más utilizada en la valoración del daño estructural es la de *Kellgren y Lawrence* (Tabla I).

Tabla I. Escala de valoración de daño estructural de Kellgren y Lawrence (5).

Grado 0	Radiografía normal
Grado I	Posible pinzamiento del espacio articular y dudosa presencia de osteofitos
Grado II	Presencia de osteofitos y posible disminución del espacio articular
Grado III	Múltiples osteofitos de tamaño moderado, disminución del espacio articular y alguna esclerosis subcondral y posible deformidad de los extremos óseos
Grado IV	Marcados osteofitos, con importante disminución del espacio articular, esclerosis severa y deformación de los extremos óseos.

En la actualidad no existe ningún tratamiento efectivo frente a la artrosis, más allá de fármacos que alivian el dolor y la impotencia funcional, entre ellos se administran paracetamol o antiinflamatorios en las fases más agudas de la enfermedad o tratamientos locales con infiltraciones para aliviar el dolor en pacientes que tengan la patología más avanzada. En último extremo, cuando la articulación está muy deteriorada, se recurre al reemplazo de esta por una prótesis articular.

1.2 La genética en la artrosis.

La artrosis es una enfermedad de etiología multifactorial, incluyendo factores modificables como la ocupación, peso, hábito tabáquico, práctica deportiva, etc, y no modificables como el sexo, la edad o la genética. Una de las estrategias utilizadas para buscar genes relacionados con la artrosis fueron los estudios de asociación de genoma completo (GWAS en inglés, *Genome-Wide Association Studies*), destacando el factor de crecimiento diferencial 5 (GDF5) y la proteína frizzled (FRZB) como los genes que más se han replicado en poblaciones independientes, aunque todavía está en discusión la relación de la vía Wnt en la artrosis (6). Asimismo, estudios en gemelos han permitido demostrar que los factores genéticos contribuyen en más de un 50% a la aparición de la artrosis. Por ejemplo, la artrosis de cadera que es menos frecuente que la de rodilla o manos, afecta a un 4.4% de manera sintomática en la población en adultos de más de 55 años de edad siendo menor en mujeres (3.6%) y mayor en hombres (5.5%) (7).

1.3 La mitocondria en la artrosis. Haplogrupos mitocondriales.

Como se ha dicho anteriormente, los condrocitos son el único tipo celular presente en el cartílago articular y se nutren por difusión desde el hueso subcondral y a través del fluido sinovial. Los condrocitos presentan un metabolismo glicolítico, sin embargo hay evidencias que sugieren que la mitocondria está relacionada con la patogénesis de la enfermedad (8, 9).

La mitocondria es un orgánulo celular cuya función principal es la de generar energía para la célula. La mitocondria está recubierta por 2 membranas, una interna y otra externa, y tiene su ADN propio, el ADN mitocondrial (ADNmt). El ADNmt está constituido por 16.569 pares de bases (pb) que codifican para 37 genes (22 ARN de transferencia, 2 ARN ribosómicos y 13 péptidos de la cadena respiratoria mitocondrial) y cada célula presenta entre 1000 y 10000 copias. El ADNmt se transmite por herencia materna y presenta una mayor tasa mutacional que el ADN nuclear debido a que carece de mecanismos de corrección, ausencia de

empaquetamiento con histonas, presenta un elevado número de rondas de replicación y una gran exposición a radicales libres procedentes de la respiración celular.

Estudios realizados con la técnica de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) revelaron un número estable de sitios polimórficos en el ADNmt que definen grupos de secuencias de ADNmt denominados haplogrupos mitocondriales (10). El 95% de la población Europea pertenece a uno de los 9 haplogrupos siguientes: H, I, J, K, T, U, V, W o X. Diferentes estudios han relacionado los haplogrupos mitocondriales con diversas patologías degenerativas, multifactoriales e incluso con la longevidad en humanos; asimismo, también se ha descrito su asociación con la artrosis (11-13).

Los estudios realizados por Rego y colaboradores revelaron una correlación entre los haplogrupos mitocondriales y la artrosis, demostrando que el haplogrupo J y el cluster TJ protegen frente al desarrollo de esta patología. Además los pacientes portadores del haplogrupo J y que tienen artrosis de rodilla parecen tener una disminución en cuanto a la severidad radiográfica (13). También se han encontrado asociaciones entre los niveles de biomarcadores de degradación de cartílago en suero con los haplogrupos mitocondriales en pacientes con artrosis de rodilla, así como entre los haplogrupos y los grados radiológicos de *Kellgren y Lawrence*, estando estos marcadores disminuidos en el haplogrupo J y aumentados en el H (14). Por tanto se podría decir que el haplogrupo H y J conforman dos fenotipos diferentes de artrosis (15).

El mecanismo propuesto para explicar las diferencias entre los haplogrupos se basaría en las distintas características metabólicas de estos, reflejado en el funcionamiento del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial. La fosforilación oxidativa tiene 2 funciones principales: proveer a la célula de energía en forma de ATP y generar calor para regular la temperatura. Uno de los factores implicados en la artrosis es la

producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*). Teniendo en cuenta la teoría de Mishmar y Wallace (16), en base a la cual la selección climática modeló los diferentes haplogrupos Europeos, algunos de los polimorfismos que caracterizan al haplogrupo J reducen la eficiencia del acoplamiento oxidativo, disminuyendo así la producción de ATP y manteniendo la cadena de transporte de electrones más oxidada, reduciendo por tanto la producción de ROS y la apoptosis. Mientras esta secuencia representaría un factor de riesgo para enfermedades causadas por deficiencia de ATP, podría ser protectora frente a enfermedades causadas por el estrés oxidativo, como es la artrosis y otras enfermedades degenerativas (13).

1.4 Especies reactivas de oxígeno. Estrés oxidativo y su influencia en el desarrollo de la artrosis.

En la mitocondria tiene lugar la fosforilación oxidativa, es decir la respiración celular acoplada a la producción de energía en forma de ATP. Pero este proceso genera especies reactivas de oxígeno que son eliminadas por diferentes enzimas celulares para evitar su acumulación, ya que en elevadas concentraciones son extremadamente tóxicas para la célula.

La fosforilación oxidativa genera ATP pero también produce calor. La fuerza protón/motriz generada por los distintos complejos de la cadena respiratoria es la necesaria para la síntesis de ATP por el complejo V. Existen en la célula enzimas desacoplantes mitocondriales, que regulan el transporte de protones hacia el exterior y el interior de la membrana mitocondrial. Mutaciones en la enzima UCP2 (*Uncoupling Protein 2*), una de las principales responsables de que este equilibrio sea adecuado, pueden alterar el equilibrio de la fuerza protón/motriz generando una mayor producción de ROS (Figura 2).

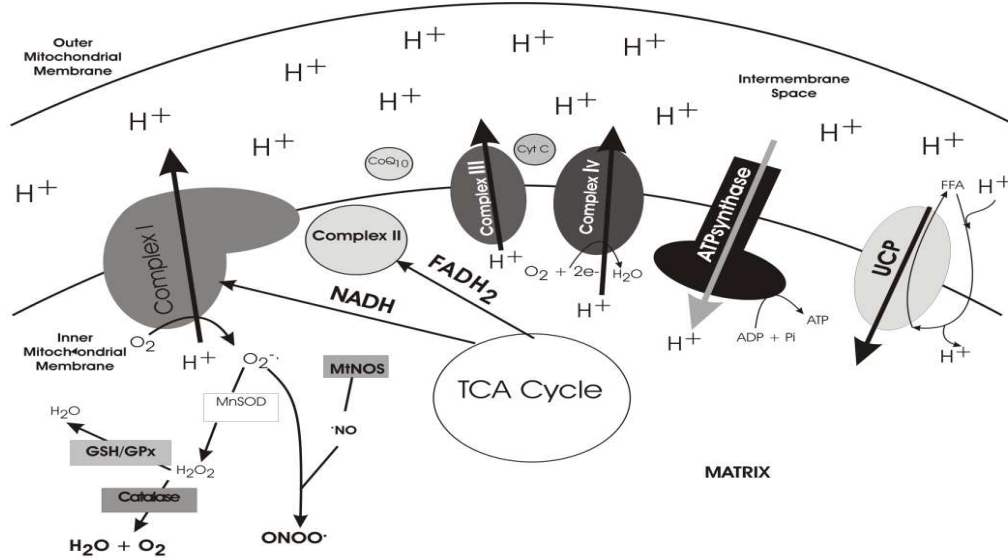


Figura 2. Esquema de la cadena transportadora de electrones (17). Los electrones se van transportando a través de los complejos de la cadena respiratoria para producir energía en forma de ATP por el gradiente de protones a través del complejo V. Sistemas antioxidantes endógenos ayudan a la detoxificación de especies reactivas de oxígeno que se generan en la respiración celular.

La edad celular lleva asociada una pérdida de la proliferación celular y de síntesis de matriz extracelular, así como un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y mediadores inflamatorios (18). Tejidos con baja proliferación celular, como el músculo o el cartílago, se ven afectados por el proceso de envejecimiento, debido en gran medida a las especies reactivas de oxígeno que inducen toxicidad.

Estudios recientes han mostrado evidencias que apoyan que la disfunción mitocondrial está implicada en la patogénesis de la artrosis (8), relacionando la disfunción mitocondrial en condrocitos con un aumento de citoquinas que inducen inflamación a través de una elevada producción de ROS (19). Los niveles de ROS están controlados en parte por la cantidad y actividad de las enzimas antioxidantes, entre ellas la superóxido dismutasa 2 (SOD2), la cual se ha demostrado que está reprimida en el cartílago artrósico, provocando un aumento de los niveles de anión superóxido a nivel mitocondrial (20).

Tal y como se describió anteriormente, para minimizar el daño inducido por las especies reactivas de oxígeno, la mitocondria y la célula tienen

enzimas que se encargan de realizar esta función, entre las cuales destacan la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) (21). Existen una serie de polimorfismos en los genes que codifican para estas enzimas y que se asocian con una disminución en la expresión de los genes que las codifican, pudiendo por tanto estar involucrados en el proceso artrósico.

1.5 Justificación de los polimorfismos propuestos y breve descripción de cada uno.

Se requiere un buen sistema de detoxificación para evitar que las especies reactivas de oxígeno dañen las células. En pequeñas concentraciones, las especies reactivas de oxígeno actúan como mensajeros y permiten atacar a patógenos cuando estos invaden la célula, pero el desequilibrio entre su producción y su eliminación eleva las concentraciones de ROS contribuyendo al desarrollo de muchas enfermedades como el cáncer, la hipertensión, la diabetes o la inflamación (22).

1.5.1 Superóxido dismutasa

La familia de las superóxido dismutasas constituyen la primera línea de defensa de enzimas antioxidantes frente a ROS y en concreto frente a los aniones superóxido (O_2^-). Existen 3 enzimas en los mamíferos con su estructura genómica, su ADN codificante y sus proteínas descritas. Dos isoformas tienen cobre y zinc en su centro catalítico y están localizadas en el interior de compartimentos diferentes (SOD1) o en medio extracelular (SOD3). Una tercera isoforma de la familia de las superóxido dismutasas contiene manganeso (Mn) como cofactor y está localizada en la mitocondria de células aerobias (Mn-SOD o SOD2). Existe como homotetrámero con una subunidad individual cuyo peso ronda los 23.000 Daltons (Da). SOD2 juega un papel importante en la diferenciación celular y en la protección frente a la hiperoxia que induce toxicidad.

El gen de SOD2 está localizado en el cromosoma 6q.25.3 y consta de 5 exones y 4 intrones. SOD2 se sintetiza como respuesta al estrés oxidativo, aunque también puede expresarse por la presencia de interferón gamma (IFN-gamma) o de citoquinas proinflamatorias (22). La proteína transforma los aniones superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno diatómico (O_2). Mutaciones en este gen están asociadas con enfermedades como miocardiopatías o cáncer (23).

El polipéptido sintetizado por SOD2 tiene que transportarse a través de las membranas mitocondriales al interior de la matriz, donde una enzima la convertirá en la forma activa. El transporte está mediado por la presencia de una secuencia señal en la región N-terminal del polipéptido. El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) rs4880 provoca una transversión de C por T en una región codificante, sustituyendo una alanina (GCT) por una valina (GTT) en el codón 16, lo que puede causar un cambio en la hélice alfa de la estructura de SOD2 afectando por tanto a la localización y a la eficiencia del transporte de la enzima hasta el interior de la mitocondria (22).

Sin embargo existen discrepancias sobre la expresión de la enzima según el genotipo de SOD2; según Sutton y colaboradores (24) la variante salvaje (C) genera entre un 30-40% más de enzima activa y permite una mayor eficiencia importando la proteína al interior de la mitocondria que el alelo mutante, sugiriendo por tanto que el genotipo homocigoto salvaje debe tener mayor actividad de la enzima que el homocigoto mutante. En cambio Silvia Funke y colaboradores (25) han asociado el alelo mutante (T) con una sobreexpresión de la enzima, resultando en un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno, lo cual aumentaría los niveles de ROS si no son neutralizados a través de las enzimas adecuadas.

1.5.2 Glutación peroxidasa (GPX)

Existen tres familias de enzimas que rompen el peróxido de hidrógeno: catalasas, glutación peroxidasa y peroxiredoxinas. La catalasa es la enzima clave para la transformación del peróxido de hidrógeno en los peroxisomas. A bajas concentraciones de H_2O_2 , la glutación peroxidasa y las peroxiredoxinas son los encargados de su degradación. La catalasa interviene cuando las concentraciones de peróxido de hidrógeno en el interior celular son elevadas (26).

A diferencia de la catalasa, la glutación peroxidasa requiere de enzimas secundarias (glutación reductasa y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa) y cofactores (glutación reducido, NADPH, y glucosa 6-fosfato) para funcionar con mayor eficiencia (27). La glutación peroxidasa comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos ($ROOH$ y H_2O_2) usando glutación reducido (GSH), contribuyendo así a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo (28).

La glutación peroxidasa 1 (GPX1) se encuentra ampliamente expresada y es el miembro mejor caracterizado de la familia de las peroxidasa; en humanos el gen se localiza en el cromosoma 3. Entre los polimorfismos más comunes del gen que codifica para esta enzima se encuentra el rs1050450 (Pro198Leu), localizado dentro de la región C-terminal de la proteína. Muchos estudios han descrito que la sustitución de prolina (CCC codón) por leucina (CTC codón) aumenta el riesgo de cáncer de mama y de enfermedades de las arterias coronarias (29). La prolina es un aminoácido que cuando se encuentra al final forma una hélice alfa que puede causar un estrechamiento de la cadena, por lo tanto la sustitución por otro aminoácido provocaría un cambio en la conformación estructural del sitio activo, modificando la actividad de la enzima y por tanto produciendo un desajuste del equilibrio oxidante/antioxidante (30).

2. Objetivo

En el presente trabajo se quiere investigar el posible efecto aditivo de dos SNPs de enzimas clave en la detoxificación celular en el papel que desempeñan los haplogrupos mitocondriales en la prevalencia de la artrosis.

3. Metodología

3.1 Obtención de las muestras

Las muestras utilizadas en este trabajo proceden del Hospital Universitario de A Coruña (CHUAC) de pacientes que han sufrido fractura de cadera y están libres de artrosis o de pacientes diagnosticados de artrosis a los que se les haya realizado una cirugía para la colocación de una prótesis de cadera.

Las muestras fueron clasificadas como artrósicas o sanas según cumplieren o no los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR). Entre los criterios de exclusión cabe citar los individuos con artrosis de cadera secundaria debida a artritis reumatoide, infecciones y osteonecrosis. Este estudio se llevó a cabo conforme a la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007 del 3 de julio) y cumple los principios de la Declaración de Helsinki. El estudio y uso de las muestras utilizadas en este Proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de Galicia. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado y todas las muestras fueron anonimizadas.

3.2 Extracción de ADN

De todas las muestras de cartílago de cadera de pacientes sanos y artrósicos se aisló el ADN. Para ello se utilizó la extracción fenólica basada en la propiedad de la mayor solubilidad de los ácidos nucleicos en soluciones acuosas en relación a solventes orgánicos.

El protocolo utilizado combinó el uso de tampones de lisis para romper el tejido, con detergentes para desnaturalizar proteínas y enzimas proteolíticas para degradarlas. A continuación se utilizaron diferentes solventes orgánicos, como el cloroformo, isopropanol y etanol, para hacer una separación de los componentes en fases por centrifugación. Basándonos en la solubilidad del ADN, éste se encuentra en la fase soluble y el resto de componentes en la fase orgánica. Tras

centrifugaciones seriadas se obtuvo un pellet de ADN que se resuspendió en agua y se cuantificó.

Para la cuantificación se hizo uso del espectrofotómetro NanoDrop®. El ADN obtenido cumplía los requisitos de los ratios 260/280 (pureza) y 260/230 (contaminación con solventes orgánicos) con valores entre 1,7 - 2.

3.3 Asignación de los haplogrupos mitocondriales

Para la asignación de los haplogrupos se utilizó el método SBE (de las siglas en inglés: *Single Base Extension*) el cual se describe a continuación.

3.3.1 Amplificación mediante PCR

En primer lugar se llevó a cabo una amplificación por PCR de 50 ng de ADN de la región donde se encuentran los polimorfismos que identifican los haplogrupos Europeos más comunes.

Las proporciones en la mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL fueron las siguientes:

- 1X *Reaction Buffer* (Bioline)
- 0.2 mM de cada deoxinucleótido (dNTP) (Bioline)
- 1.5 mM MgCl₂ (Bioline)
- 0.025 U/µL de BioTaq DNA polimerasa (Bioline)
- 0.2 µM de cada cebador.

Para llevar a cabo la amplificación se utilizó el siguiente programa de temperaturas en el termociclador Veriti (Applied Biosystems ®):

- Desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos,
- 45 ciclos de amplificación que constan de:

94°C durante 60 segundos (s), proceso de desnaturalización.

55°C durante 60 s, proceso de hibridación.

72°C durante 60 s, proceso de extensión.

- Extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Para comprobar la amplificación del producto de PCR, éstos fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en Tris-borato-EDTA (TBE).

3.3.2 Purificación de los productos de PCR

Tras comprobar la correcta amplificación de las muestras, se procedió a la purificación de los productos de PCR con ExoSap-IT (illustra™ ExoProStar™ 1-Step, Healthcare) según la recomendación del fabricante.

El ExoSap-IT es una mezcla de 2 enzimas, una exonucleasa que desnaturaliza los fragmentos de cebadores sobrantes y una fosfatasa alcalina que desnaturaliza los dNTPs no incorporados. El programa tiene 2 rampas de temperatura, la primera de 37° para activar las enzimas y la segunda de 80° para inactivarlas. Este paso es importante para evitar contaminaciones en los pasos siguientes del proceso de secuenciación.

3.3.3 Ensayo SBE

Esta técnica se basa en el uso de un cebador específico y complementario a la región contigua al extremo 3' de la base que queremos interrogar. Por tanto, al sintetizar la nueva cadena, la Taq polimerasa incorporará la base complementaria correspondiente, desvelando la identidad del SNP de interés. En esta técnica se utilizan solamente dideoxinucleótidos terminadores (ddNTPs), que carecen del grupo OH en el carbono 3 del azúcar impidiendo por tanto la elongación de la cadena (31). Para ello se utilizó la mezcla descrita por Rego y colaboradores que consistió en reactivo SNaPshot® Multiplex Kit (ThermoFisher) (1.5 µL) que ya contiene tampón, los ddNTPs y la

polimerasa, además se añadió el cebador específico de SBE (0.2 μ M) y se completó hasta un volumen de 10 μ L con agua (31).

Las condiciones del termociclador para SBE fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 96°C durante 60 s y 25 ciclos de 96°C durante 10 s, 60°C durante 5 s y 60°C durante 30 s.

3.3.4 Purificación de los productos de SBE

Los productos resultantes de la reacción de SBE fueron purificados con fosfatasa alcalina, una enzima que degrada los ddNTPs sobrantes no incorporados. En este caso el reactivo utilizado fue Fast-AP (ThermoFisher). Siguiendo las recomendaciones del fabricante se añadió al producto de SBE la siguiente mezcla: 1 μ L de enzima, 2 μ L de tampón y 7 μ L de agua. Con 2 rampas de temperatura de nuevo, a 37° para activar la enzima (15 minutos) y a 75° para inactivarla (15 minutos).

3.3.5 Identificación de los polimorfismos

Al producto purificado con Fast-AP (0,5 μ L) se le añadió Formamida (Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems)) (9,15 μ L), que actúa de vehículo para separar los fragmentos en el interior de los capilares del secuenciador (ABI 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems), además de un marcador de peso molecular interno (GeneScan™ 120 LIZ™ dye Size Standard, Thermo Fisher) (0,35 μ L) para saber el tamaño de los fragmentos. La mezcla con el marcador se desnaturalizó a 95° durante 5 minutos antes de cargar las muestras en el secuenciador.

Una vez finalizada la carrera, los datos se analizaron mediante el software Genemapper v.3.5 (Applied Biosystems), el cual asigna los polimorfismos, previo diseño de una secuencia de referencia.

3.4 Identificación de los SNPs

Los SNPs rs4880 en SOD2 y rs1050450 en GPX1 también fueron identificados usando la técnica de SBE.

Los pasos a seguir son iguales que en el protocolo anterior, de modo que en primer lugar se realizó la amplificación por PCR de cada uno de los fragmentos que contenían los diferentes SNPs a partir de 50 ng de ADN. Los cebadores empleados se describen en la tabla II. La mezcla de reacción en un volumen final de 25 μ L fue la siguiente:

- 1X *Reaction Buffer* (Bioline)
- 0.2 mM de cada deoxinucleótido (dNTP) (Bioline)
- 1.5 mM MgCl₂ (Bioline)
- 0.025 U/ μ L de BioTaq DNA polimerasa (Bioline)
- 0.2 μ M de cada cebador (Tabla II).

Para llevar a cabo las PCRs se utilizó el siguiente programa de temperaturas en el termociclador:

- Desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos,
- 35 ciclos de amplificación que constan de:
 - 94°C durante 60 s, proceso de desnaturalización.
 - 55°C durante 60 s, proceso de hibridación.
 - 72°C durante 60 s, proceso de extensión.
- Extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Tabla II. Secuencia de los cebadores y tamaño del amplicón.

SNP	Sentido (5´-3´)	Antisentido (5´-3´)	Tamaño del amplicón
GPX1	GTTGCCTGGAACCTTTGAGA	GACACAGGACATACACACA	367 nt
SOD2	ATCAGCGGTAGCACCA	GGTACTTCTCCTCGGTGA	< 100 nt

Tras comprobar que los fragmentos habían amplificado corriendo las muestras en un gel de agarosa al 1.5% en TBE, se purificó el producto de PCR con ExoSap-IT y se realizó la reacción de SBE con el reactivo SNaPshot® Multiplex Kit (ThermoFisher) (1.5 µL) además del cebador específico de SBE (0.2 µM) para cada SNP (Tabla III) y se completó hasta un volumen de 10 µL con agua.

Tabla III. Secuencia de los cebadores de SBE.

SNP	Cebador SBE
GPX1	gactgactgactgactgactgactAAGCCCTGCTGTCTCAAGGGC
SOD2	gactgactgactgactgactgactgactgactgactTGGAGCCCAGATACCCCAA

El producto de SBE se purificó con Fast-AP siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.3.4. A continuación se le añadió Hi-Di™ Formamide (9,25 µL) y el marcador de peso molecular interno (GeneScan™ 120 LIZ™ dye Size Standard, Thermo Fisher) (0,25 µL) que se desnaturalizó a 95° durante 5 minutos antes de cargar las muestras en el secuenciador.

Al finalizar la carrera, los datos se analizaron mediante el software Genemapper v.3.5, el cual asigna los polimorfismos (Figuras 3-6), a partir de una secuencia de referencia.

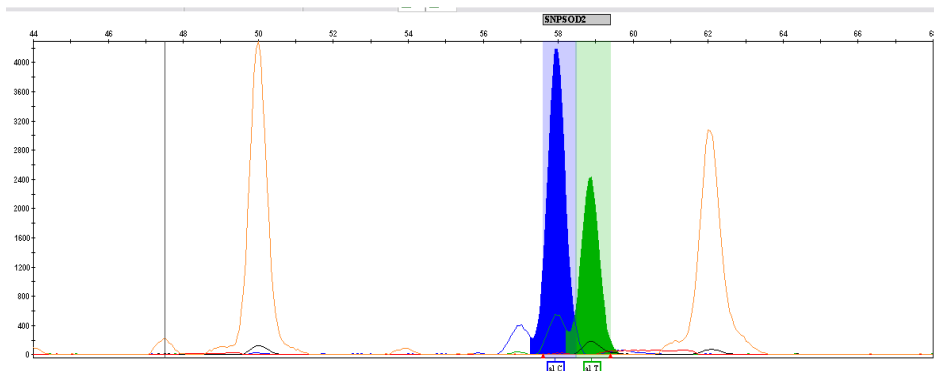


Figura 3. Electroferograma del genotipo CT del polimorfismo rs4880 del gen SOD2.

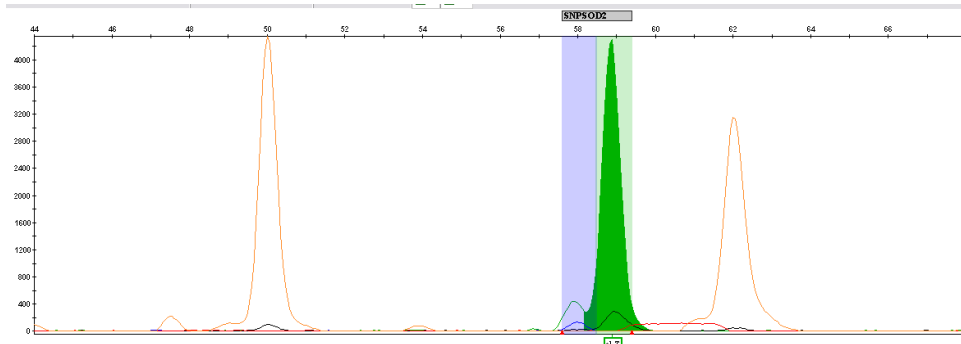


Figura 4. Electroferograma del genotipo TT del polimorfismo rs4880 del gen SOD2.

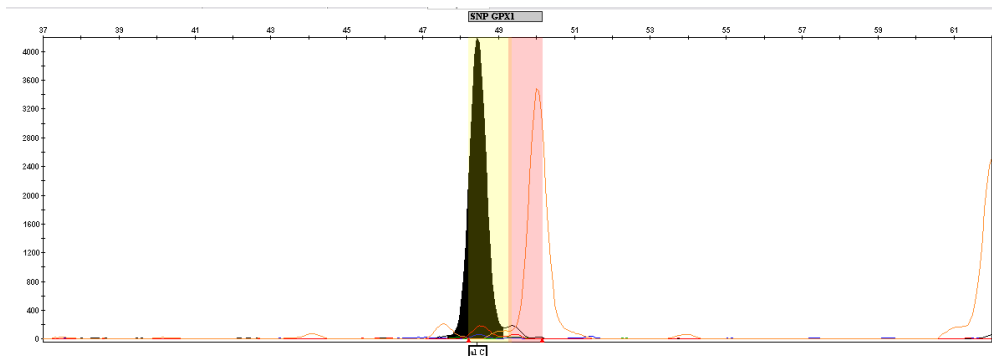


Figura 5. Electroferograma del genotipo CC del polimorfismo rs1050450 del gen GPX1.

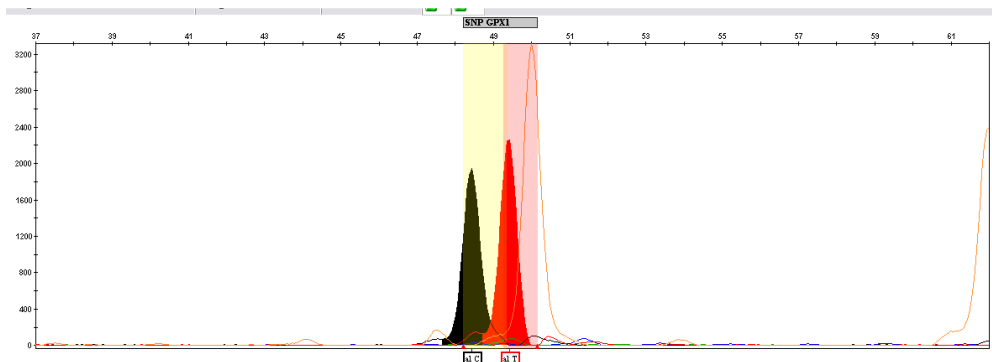


Figura 6. Electroferograma del genotipo CT del polimorfismo rs1050450 del gen GPX1.

3.5 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el software SPSS v19 por medio de tablas de contingencia chi cuadrado estructurados por clusters y genotipos. Se calcularon los Odd Ratios (OR) y sus Intervalos de Confianza (I.C.) al 95% para asignar la probabilidad de padecer artrosis de cadera en función de los genotipos.

4. Resultados

En este trabajo se han estudiado 350 individuos de raza Caucásica de la zona Noroeste de España, de los cuales 233 eran individuos con artrosis de cadera y 117 controles sanos de artrosis de cadera. La media de edad para los pacientes fue de 70.18 ± 11.7 años con un intervalo de edades comprendido entre 59 y 81 años. No se observaron diferencias significativas en la distribución del sexo y la edad en función de los clusters mitocondriales, sin embargo, sí se detectó una diferente distribución por edades a nivel de los genotipos de GPX1 ($p=0.004$) (Tabla IV).

Tabla IV. Tabla descriptiva de los clusters y los SNPs por sexo y edad.

Variables	Clusters				p-valor	Total (N=350)	SOD2		p-valor	SNPs			Total (N=281, 100%)	
	HV (N=185, 52.9%)	KU (N=87, 24.9%)	TJ (N=51, 14.6%)	Otros (N=27, 7.7%)			CC/CT (N=224, 75.4%)	TT (N=73, 24.6%)		Total (N=297, 100%)	GPX1			p-valor
											CC (N=123, 43.8%)	CT/TT (N=158, 56.2%)		
Sexo					0.957 [#]				0.243 [#]				0.825 [#]	
Hombre	79 (42.7)	38 (43.7)	20 (39.2)	12 (44.4)		149 (42.6)	93 (72.1)	36 (27.9)		129 (100)	53 (44.5)	66 (55.5)	119 (100)	
Mujer	106 (57.3)	49 (56.3)	31 (60.8)	15 (55.6)		201 (57.4)	131 (78.0)	37 (22.0)		168 (100)	70 (43.2)	92 (56.8)	162 (100)	
Edad (años)	71.05±11.1	68.45±12.4	68.25±12.3	73.41±12.1	0.149 [*]	70.18±11.7	69.46±12.1	70.45±11.4	0.814 [†]	69.7±11.4	67.3±11.0	71.29±11.9	0.004[†]	69.73±11.9

Los valores indicados se expresan como número de pacientes con los porcentajes indicados entre paréntesis. (*) Test no paramétrico Kruskal-Wallis; (†) Test no paramétrico de Mann-Whitney; (#) Test Chi-cuadrado; significancia estadística declarada a p≤0.05 (en negrita)

4.1 Estudio de replicación.

Debido al escaso tamaño muestral al tratarse de resultados preliminares, los análisis se realizaron agrupando los haplogrupos en Clusters mitocondriales. Los Clusters mitocondriales engloban aquellos haplogrupos que presentan un origen filogenético común: HV, KU, TJ, Otros.

La frecuencia del cluster TJ en controles sanos fue del 20.5 % y en pacientes artrosicos del 11.6 %, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (OR=0.513; IC 95%=0.281-0.936; p=0.028); para el cluster HV la frecuencia fue mayor en pacientes artrosicos 55.8 % que en pacientes sanos 47.0 % aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla V).

Tabla V. Distribución de los clusters según la condición de sanos o artrosicos.

Clusters	Sano	Artrosico	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
	(N=117, 100%)	(N=233, 100%)	(N=350, 100%)		Inferior	Superior	
HV	55 (47)	130 (55.8)	185 (52.9)	1.451	0.928	2.268	0.102 [#]
KU	30 (25.6)	57 (24.5)	87 (24.9)	0.955	0.573	1.594	0.862 [#]
TJ	24 (20.5)	27 (11.6)	51 (14.6)	0.513	0.281	0.936	0.028[#]
Otros	8 (6.8)	19 (8.2)	27 (7.7)	5.321	0.673	42.082	0.077 [#]

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis. (#) Test Chi-cuadrado; I.C.: intervalo de confianza; OR: Odd Ratio; significancia estadística declarada a p≤0.05 (en negrita)

4.2 Estudio de asociación de genotipos nucleares.

Las frecuencias de los genotipos en el caso del polimorfismo rs4880 del gen SOD2 fueron: 76.8% para el genotipo CC/CT y 23.2% para el TT en pacientes artrosicos, mientras que en los controles sanos las frecuencias de estos genotipos fueron 72.8% y 27.2% respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre sujetos sanos y enfermos para este SNP (Tabla VI).

Tabla VI. Distribución de los genotipos de rs4880 por condición de sanos o artrósicos.

	Sano	Artrósico	Total		I.C. 95%		
rs4880 (SOD2)	(N=103, 100%)	(N=164, 100%)	(N=297, 100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
TT	28 (27.2)	45 (23.2)	73 (24.6)	0.809	0.468	1.398	0.447 [#]
CC/CT	75 (72.8)	149 (76.8)	224 (75.4)				

Los valores se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis. ; I.C: intervalo de confianza; OR: Odd Ratio; ([#]) Test Chi-cuadrado.

Las frecuencias de los genotipos en el caso del polimorfismo rs1050450 del gen GPX1 fueron: 46.3% para el genotipo CC y 53.7% para el genotipo CC/CT en los pacientes artrósicos, mientras que las frecuencias de estos genotipos en los controles sanos fueron 39.6% y 60.4% respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre sujetos sanos y enfermos para este SNP (Tabla VII).

Tabla VII. Distribución de los genotipos de rs1050450 por condición de sanos o artrósicos.

	Sano	Artrósico	Total		I.C. 95%		
rs1050450 (GPX1)	(N=106, 100%)	(N=175, 100%)	(N=281, 100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
CT/TT	64 (60.4)	94 (53.7)	158 (56.2)	0.762	0.467	1.243	0.275 [#]
CC	42 (39.6)	81 (46.3)	123 (43.8)				

Los valores se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; I.C: intervalo de confianza; OR: Odd Ratio; ([#]) Test Chi-cuadrado.

4.3 Estudio de las interacciones entre los clusters mitocondriales y los genotipos nucleares.

Los análisis de las interacciones se realizaron en función de la pertenencia o no del sujeto al cluster TJ, que es el que se asocia de forma significativa como factor protector frente a la enfermedad.

Para estudiar la interacción de los clusters con el polimorfismo rs4880 del gen SOD2 se utilizó como combinación de referencia el cluster TJ con el genotipo TT (TJ.TT). Los resultados mostraron una distribución de frecuencias diferente en sanos y enfermos (Figura 3). El análisis de

regresión ajustado por sexo y edad mostró que los portadores del cluster TJ en combinación con el genotipo TT presentan un menor riesgo (aunque no significativo) de desarrollar artrosis que los sujetos no pertenecientes a este cluster y portadores del genotipo CC/CT (OR=3.228; IC 95%=0.818-12.743; p=0.094), si bien, debido al escaso tamaño muestral de esta combinación estos resultados hay que tomarlos con precaución (Tabla VIII).

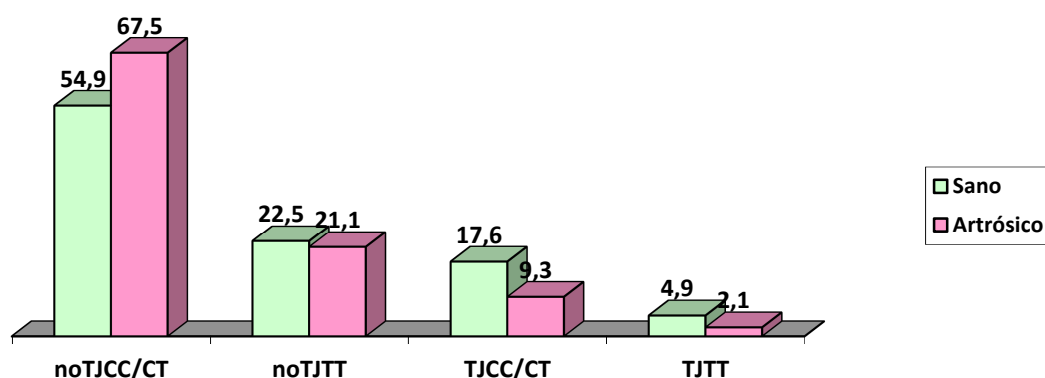


Figura 3. Representación gráfica de las frecuencias de las diferentes interacciones entre el cluster TJ y el genotipo de SOD2 estratificados por condición de sanos o artrósicos.

Tabla VIII. Interacción de los genotipos de rs4880 (SOD2) y grupos de clusters ajustados por sexo y edad.

	I.C. 95%			p-valor
	OR	Inferior	Superior	
Sexo	1.792	1.074	2.990	0.026[#]
Edad	1.000	0.978	1.022	0.982 [#]
TJ_SOD2				0.065 [#]
TJ.CC/CT vs TJ.TT	1.406	0.314	6.302	0.656 [#]
noTJ.CC/CTvs TJ.TT	3.228	0.818	12.743	0.094 [#]
noTJ.TT vs TJ.TT	2.361	0.565	9.862	0.239 [#]

OR: Odd Ratio; IC: Intervalo de confianza; (#) Test Chi-cuadrado; significancia estadística declarada a $p \leq 0.05$ (en negrita)

Para estudiar la interacción de los clusters con el polimorfismo rs1050450 del gen GPX1 se utilizó como combinación de referencia el cluster noTJ con el genotipo CC. Los resultados mostraron una distribución de frecuencias diferente en función de las combinaciones en sanos y enfermos (Figura 4). El análisis de regresión ajustado por sexo y edad mostró que los portadores del cluster TJ en combinación con el genotipo CC presentan un menor riesgo de desarrollar artrosis que los sujetos no pertenecientes a este cluster pero portadores igualmente del genotipo CC (OR=0.258; IC 95%=0.096-0.694; p=0.007), revelando un efecto aditivo en esta asociación (Tabla IX).

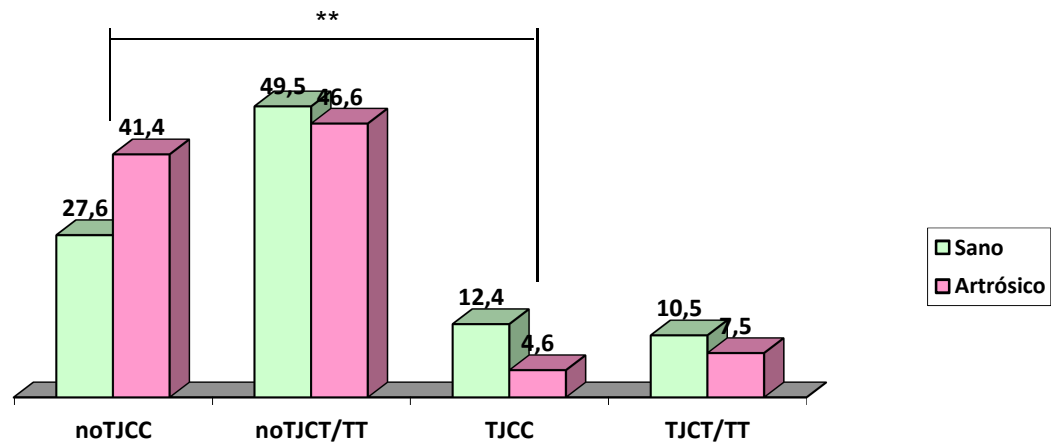


Figura 4. Representación gráfica de las frecuencias de las diferentes interacciones entre el cluster TJ y el genotipo de GPX1 estratificados por condición de sanos o artrósicos. (**) p-valor<0.01

Tabla IX. Interacción de los genotipos de rs1050450 (GPX1) y grupos de clusters ajustados por sexo y edad.

	I.C. 95%			
	OR	Inferior	Superior	p-valor
Sexo	1.619	0.968	2.707	0.066 [#]
Edad	0.997	0.976	1.019	0.800 [#]
TJ_GPX1				0.037[#]
TJ.CT/TT vs noTJ.CC	0.468	0.187	1.172	0.105 [#]
TJ.CC vs noTJ.CC	0.258	0.096	0.694	0.007[#]
noTJ.CT/TT vs noTJ.CC	0.643	0.366	1.133	0.126 [#]

OR: Odd Ratio; IC: Intervalo de confianza ([#]) Test Chi-cuadrado; significancia estadística declarada a p≤0.05 (en negrita)

5. Discusión.

La artrosis es una enfermedad multifactorial que tiene un componente genético importante (6). Se ha demostrado el papel de la mitocondria en la contribución al desarrollo de esta patología no sólo a nivel de la propia disfunción mitocondrial (8) sino también a nivel de determinados polimorfismos que presenta el ADN mitocondrial, conocidos como haplogrupos mitocondriales. Rego y colaboradores pusieron de manifiesto que el haplogrupo J y el cluster TJ ejercen un papel protector frente al desarrollo de esta patología, al contrario que el haplogrupo H, que a pesar de ser un haplogrupo más eficiente energéticamente, genera a su vez una mayor producción de ROS, y que parece mostrar un comportamiento más antagónico (8). El estudio realizado por Soto-Hermida y colaboradores (32) replicó los resultados por los cuales el haplogrupo J ejercía un papel protector frente al desarrollo de la artrosis y en nuestro estudio hemos vuelto a confirmarlo con el cluster TJ. Ambos haplogrupos J y T han sido descritos como haplogrupos “hermanos” porque comparten un origen filogenético común y diferentes estudios apoyan la idea de que estos dos haplogrupos se caracterizan por la presencia de polimorfismos que inducen un comportamiento desacoplante en la mitocondria el cual, en combinación con determinadas variantes genéticas nucleares, conduciría a una disminución de la producción de ATP (16, 33, 34) y consecuentemente una reducción en la producción de ROS.

Las especies reactivas de oxígeno producen daño en el ADN y tejidos, producen inflamación y son un factor de riesgo importante para el desarrollo de diferentes enfermedades. En pequeñas concentraciones, actúan como mensajeros secundarios y permiten atacar a patógenos cuando éstos invaden la célula, pero el desequilibrio en los procesos de detoxificación eleva peligrosamente las concentraciones de ROS contribuyendo al desarrollo de enfermedades como el cáncer, la hipertensión, la diabetes o la inflamación (22). Las especies reactivas de oxígeno se generan como consecuencia de la acción de la cadena de transporte electrónico y son neutralizadas bajo la acción de enzimas como

SOD2, catalasa y GPX las cuales, tras una serie de reacciones, las convierten en moléculas inocuas, como el O₂ y el agua. Sin embargo polimorfismos en la secuencia de los genes que codifican estas enzimas, pueden llevar a cambios en la actividad enzimática, asociándose con el riesgo de padecer diferentes enfermedades entre las que se podría encontrar la artrosis.

Existe cierta controversia en cuanto al significado del polimorfismo rs4880 de SOD2. La variante salvaje (C), según Sutton y colaboradores (24), genera entre un 30-40% más de enzima activa y permite una mayor eficiencia detoxificadora que la variante mutante, sugiriendo por tanto que el genotipo homocigoto salvaje debe tener una mayor actividad de la enzima que el homocigoto mutante. Sin embargo Silvia Funke y colaboradores (25) han asociado el alelo mutante (T) con una sobreexpresión de la enzima, resultando en un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno, lo cual elevaría los niveles de ROS si estos no son neutralizados a través de las enzimas adecuadas. En nuestro trabajo hemos tratado de buscar interacciones entre el polimorfismo de la enzima y los haplogrupos mitocondriales, encontrando que el grupo noTJ formado por los clusters KU, HV y Otros, en combinación con el genotipo CC/CT ocurre con mayor frecuencia en pacientes artrósicos, aumentando por tanto el riesgo de padecer la enfermedad. Es decir, no solo el hecho de no pertenecer al cluster TJ sino que además ser portador del alelo C aumentaría el riesgo de artrosis, especialmente si se compara con aquellos sujetos que, perteneciendo al cluster TJ, portan el genotipo TT. Sin embargo, probablemente debido al escaso tamaño muestral, los resultados no alcanzaron la significación estadística, aunque la tendencia es bastante clara.

La presencia de SOD2 se ha visto disminuida en la matriz de la superficie del cartílago de pacientes artrósicos (35); asimismo, la expresión de ARN mensajero y de proteína es menor en el cartílago de pacientes artrósicos, lo que podría justificar un aumento de los niveles de anión superóxido, tal

y como ha sido propuesto (20). Estos resultados estarían en la línea de lo expuesto por Silvia Funke y colaboradores (25) ya que se podría hipotetizar que la presencia del genotipo salvaje (C) en uno de los alelos disminuye la cantidad de enzima, manteniendo elevados los niveles de anión superóxido al no poder ser neutralizados con efectividad. Si no se elimina con eficacia, el anión superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico, un gas producido en concentraciones elevadas en la articulación artrosica, originando el peroxinitrito. Este radical es un potente oxidante que daña la cadena de transporte de electrones así como proteínas y enzimas mitocondriales.

La glutatión peroxidasa es, junto con la catalasa, una de las enzimas encargadas de la eliminación del peróxido de hidrógeno transformándolo en agua (26). El polimorfismo más común en este gen es el rs1050450 (Pro198Leu), localizado dentro de la región C-terminal de la proteína. La variante mutante (T) en este caso se ha asociado a enfermedades de las arterias coronarias y cáncer de mama (29). En nuestro trabajo se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa al comparar portadores del genotipo CC en el cluster TJ y portadores de este mismo genotipo fuera del cluster TJ ($p=0.007$). Esto indicaría que el papel protector del cluster TJ, tal y como se ha demostrado previamente (13, 32) y confirmado en este estudio, se vería reforzado por la presencia del genotipo CC de GPX1. Es decir, aunque el factor protector frente a la artrosis recaiga principalmente en el cluster TJ, la interacción de este con el genotipo silvestre del SNP rs1050450 (CC, Pro-Pro) disminuiría el riesgo de padecer artrosis provocando un efecto aditivo sobre la propia asociación con el cluster TJ. Este hallazgo va en la línea de lo estudiado en una población china en cuanto a la enfermedad osteoarticular degenerativa de Kashin-Beck, en la que ser portador del alelo mutante (T) aumenta el riesgo de padecer esta enfermedad y además se veía disminuida la expresión de GPX1 en cartílago y en sangre, siendo estadísticamente significativa en la última, lo que conlleva a una disminución de la actividad en pacientes con la patología osteoarticular

(36). Todo ello apoyado también por lo descrito por Ravn-Haren y col. (29) que aportan que la variante mutante disminuye la actividad de GPX1.

6. Conclusiones.

1. Se confirma la asociación del cluster TJ con un menor riesgo de desarrollar artrosis en la población gallega.
2. Ser portador del alelo silvestre (C) del polimorfismo rs4880 del gen SOD2, además de pertenecer al grupo noTJ, aumenta el riesgo de padecer la enfermedad.
3. La interacción entre el cluster TJ y el genotipo homocigoto silvestre (CC) del polimorfismo rs1050450 del gen GPX1 provoca un efecto aditivo en el papel protector del cluster TJ frente al desarrollo de la artrosis.

7. Bibliografía referenciada.

1. Vega Álvarez JA, García-Suárez O, Fernández Monjil D, Del Valle Soto ME. Bioquímica y biología del cartílago articular. Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología 2002. p. 391-400.
2. Gijón HH. Herbolario Hierbabuena Gijón [Internet] 2013. [cited 2016]. Available from: <http://hierbabuenagijon.blogspot.com.es/2013/10/los-mejores-nutrientes-naturales-para.html>.
3. Loza E, Lopez-Gomez JM, Abasolo L, Maese J, Carmona L, Batlle-Gualda E, et al. Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain. Arthritis Rheum. 2009;61(2):158-65.
4. Kraus SJ. Radiologic diagnosis of a newborn with cloaca. Semin Pediatr Surg. 2016;25(2):76-81.
5. Mendieta EdM. Relevancia de los hallazgos clínicos y radiológicos en la artrosis. Revista española de Reumatología: Elsevier; 2005. p. 37-41.
6. Valdes AM, Spector TD. The contribution of genes to osteoarthritis. Med Clin North Am. 2009;93(1):45-66, x.
7. Kim C, Linsenmeyer KD, Vlad SC, Guermazi A, Clancy MM, Niu J, et al. Prevalence of radiographic and symptomatic hip osteoarthritis in an urban United States community: the Framingham osteoarthritis study. Arthritis Rheumatol. 2014;66(11):3013-7.
8. Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 2011;7(3):161-9.
9. Terkeltaub R, Johnson K, Murphy A, Ghosh S. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. Mitochondrion. 2002;1(4):301-19.
10. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, et al. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. Genetics. 1996;144(4):1835-50.
11. Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylhä M, Majamaa K. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. Hum Genet. 2003;112(1):29-33.

12. van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, et al. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett*. 2004;365(1):28-32.
13. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(8):2387-96.
14. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Deberg M, Pértega S, Fernández-López C, Oreiro N, et al. Mitochondrial DNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(4):646-52.
15. Fernández-Moreno M, Soto-Hermida A, Oreiro N, Pértega S, Fernández-López C, Rego-Pérez I, et al. Mitochondrial haplogroups define two phenotypes of osteoarthritis. *Front Physiol*. 2012;3:129.
16. 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):223-6.
17. Readnower RD, Davis LM, Sullivan PG. Novel Neuroprotective Strategies and Targets of Intervention in Epilepsy. *Epilepsy in Children – Clinical and Social Aspects: InTech*; 2011.
18. Lotz MK, Caramés B. Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(10):579-87.
19. Vaamonde-García C, Riveiro-Naveira RR, Valcárcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, López-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2012;64(9):2927-36.
20. Scott JL, Gabrielides C, Davidson RK, Swingler TE, Clark IM, Wallis GA, et al. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(8):1502-10.
21. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and

EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(3):337-49.

22. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(4):344-56.

23. SOD2 Superoxide dismutase 2, mitochondrial [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]: Ncbi.nlm.nih.gov.; 2016 [Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6648>].

24. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics.* 2003;13(3):145-57.

25. Funke S, Risch A, Nieters A, Hoffmeister M, Stegmaier C, Seiler CM, et al. Genetic Polymorphisms in Genes Related to Oxidative Stress (GSTP1, GSTM1, GSTT1, CAT, MnSOD, MPO, eNOS) and Survival of Rectal Cancer Patients after Radiotherapy. *J Cancer Epidemiol.* 2009;2009:302047.

26. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Fourth edition. Oxford University Press Inc., New York.2007.

27. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010;5(1):51-66.

28. Martín LO, Matés JM. Radicales libres de oxígeno y enzimas antioxidantes [Internet]1999. [cited 2016]. Available from: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros56/radicales.html>.

29. Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin H, et al. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis.* 2006;27(4):820-5.

30. Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, et al. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res.* 2000;60(22):6381-3.

31. Rego I, Fernandez-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 and Biology Journal: Bentham Science Publishers Ltd.*; 2008. p. 10-6.
32. Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Oreiro N, Fernández-López C, Rego-Pérez I, Blanco FJ. mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *Mitochondrion*. 2014;15:18-23.
33. Castro MG, Terrados N, Reguero JR, Alvarez V, Coto E. Mitochondrial haplogroup T is negatively associated with the status of elite endurance athlete. *Mitochondrion*. 2007;7(5):354-7.
34. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet*. 2000;67(3):682-96.
35. Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martínez-Gomariz M, Fernández M, et al. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(1):172-89.
36. Xiong YM, Mo XY, Zou XZ, Song RX, Sun WY, Lu W, et al. Association study between polymorphisms in selenoprotein genes and susceptibility to Kashin-Beck disease. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(6):817-24.