

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Cíbridos transmitocondriales como
modelo *in vitro* para estudiar la
asociación existente entre el ADN
mitocondrial y la patología artrósica

Andrea Dalmao Fernández

A Coruña 2020

TESIS DOCTORAL

(memoria presentada para optar al grado de doctor internacional)

Directores:

Dr. Francisco Javier Blanco García

Dra. Mercedes Fernández Moreno

Grupo de Investigación en Reumatología (GIR).

Instituto de Investigación Biomédica da Coruña (INIBIC).

El Dr. Francisco Javier Blanco García y la Dra. Mercedes Fernández Moreno, investigadores del Grupo de Investigación en Reumatología (GIR) del Instituto de Investigación Biomédica de la Coruña (INIBIC) y directores del presente trabajo de tesis doctoral,

CERTIFICAN QUE

La presente memoria de tesis titulada **“Cíbridos transmitocondriales como herramienta *in vitro* para estudiar la asociación entre el ADN mitocondrial y la patología artrósica”** presentada por Doña Andrea Dalmao Fernández, ha sido realizada bajo nuestra dirección y supervisión en el Grupo de Investigación en Reumatología en el INIBIC y reúne las condiciones necesarias para ser defendida públicamente optando al Grado de Doctor con mención Internacional.

Para que así conste, firman el siguiente certificado en A Coruña, con fecha:

Dr. Francisco J Blanco García

Dra. Mercedes Fernández Moreno



UiO : **Department of Pharmacy**
University of Oslo



Parte de la investigación desarrollada a lo largo de esta Tesis Doctoral ha sido realizada durante una estancia de investigación predoctoral de un mes en el año 2017 bajo la supervisión del Profesor Arild C. Rustan, líder del *Muscle Research Group* en el *Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy*, en la Universidad de Oslo (Oslo, Noruega). Dicha estancia se financió a través de las ayudas *Short Term Scientific Missions* por parte de la acción *COST Action MitoEAGLE* con el objetivo de establecer y consolidar colaboraciones internacionales que proporcionen la posibilidad de mejorar el conocimiento de la función mitocondrial en relación a la evolución, edad, género, estilo de vida y ambiente.



UiO : **Department of Pharmacy**
University of Oslo

Parte de la investigación desarrollada a lo largo de esta Tesis Doctoral ha sido realizada durante una estancia de investigación predoctoral durante 3 meses en el año 2018 bajo la supervisión de la Dra. Jenny Lund, investigadora postdoctoral del *Muscle Research Group* en el *Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy*, en la Universidad de Oslo (Oslo, Noruega). Dicha estancia se financió a través de las ayudas para estancias predoctorales Inditex-UDC con el objetivo de proporcionar la posibilidad de optar al Grado de Doctor con mención internacional, no solo facilitando el aprendizaje del estudiante en otro entorno al habitual, sino que también contribuyendo a establecer nuevas redes de trabajo y colaboraciones internacionales que permiten compartir métodos y conocimiento en el ámbito en el que se desarrolla la tesis doctoral.

*A mi hermano,
a mis padres.*

AGRADECIMIENTOS

Y pensar que, una vez llegados a este punto, esta es la parte de la tesis que más terror me da escribir...

Los que me conocen saben que la parte sentimental no es mi fuerte, pero intentaré expresar todo lo agradecida que estoy por la ayuda y el apoyo que he recibido a lo largo de todos estos años dejando la lógica a un lado.

En primer lugar, me gustaría agradecer a los donantes, sin las muestras y sin su participación, la investigación básica en biomedicina y su avance sería imposible.

También agradecer a todas aquellas instituciones que han aportado su granito de arena financiando y proporcionándome la oportunidad de completar mi formación académica: Fundación Profesor Novoa Santos, Sociedad Española de Reumatología, Instituto de Salud Carlos III, Short Term Scientific Misions from COST Action and Mitoeagle y las ayudas UDC-INDITEX. Gracias también a las plataformas de proteómica, ProteoRed, genómica e histomorfología del INIBIC, así como a los servicios de apoyo a la investigación (SAI) de la Universidad de la Coruña (UDC), sin todos estos profesionales mi formación como investigadora se reduciría considerablemente, gracias por permitirme aprender de vosotros.

En tercer lugar, y desde luego dos, de los pilares más importantes en el desarrollo de este trabajo de tesis, agradecer de todo corazón las decisiones y directrices de mis directores de tesis, el Dr. Francisco Blanco García y la Dra. Mercedes Fernandez Moreno. Gracias por haber confiado en mis capacidades y por haberme dedicado todo el tiempo del mundo. En especial a Merce, gracias por tu tesón, tu constancia, por haberte implicado tanto en mi formación, aprendizaje, crecimiento y mejora, a nivel del laboratorio y a nivel personal. Gracias a los dos por preocuparos siempre por poner a mi alcance los medios y los recursos disponibles y necesarios para llevar a cabo una investigación novedosa y de calidad. Simplemente gracias por esta oportunidad.

Me gustaría continuar agradeciendo al grupo de Genómica. Mencionar que, sin la ayuda y colaboración de Nacho, mi situación actual no sería la misma, así que gracias por apoyar y valorar el esfuerzo que conllevan estos 4 años de trabajo. Mi más sincero, profundo, grande, infinito y cariñoso gracias de todo corazón a Sara, contigo empezó todo. Te ofreciste siempre a ayudarme, enseñarme, formarme y hacerme responsable de lo que significa trabajar en grupo. Pusiste a mi disposición todo tu conocimiento y te estaré eternamente agradecida por introducirme en el mundo de la ciencia. Aunque no te guste, siempre serás "mi técnico de laboratorio" (y del grupo de genómica ;). Morena, María Eugenia, Duran y Pauli, a vosotros cuatro, gracias por haber formado parte de esta etapa. More, me has demostrado que siempre se puede y que a pesar de que las cosas no siempre son como uno quiere, me has enseñado a aceptarlas y adaptarlas a las circunstancias, así que, allá voy, espero, en mi futuro, tener tu fuerza. María gracias por todo el apoyo y por resolverme todas las dudas, creo que he aprendido mucho de ti y también de tu forma de ser, siempre altruista y disponible para los demás. Duri y Pauli me lo he pasado genial con vosotros, nuestra ironía

y retranca no nos la quitará nadie y quiero daros las gracias por el simple hecho de haber estado ahí y hacerme las cosas mucho más sencillas en esta etapa de mi vida.

Gracias al grupo de REUMA, clínicos e investigadores, realmente he aprendido que la clínica aporta un punto de vista fundamental en la investigación básica ya que nos acerca al objetivo final, ayudar a los pacientes. Gracias a Bea y Uxía por ayudarme y enseñarme siempre que lo he necesitado e Irene por dejarme ofrecerle mi ayuda. Valentina gracias por ayudarme e involucrarte hasta el último momento en mi formación, lo valoro muchísimo. Tami, sin ti no hay células, y sin células, esta tesis..., infinitamente gracias por tu paciencia y ayuda, eres una parte fundamental de este trabajo y siempre intentaré impregnarme de tu conocimiento y capacidad didáctica.

El INIBIC, y como piezas centrales de todo el instituto, María Moreno y Fani. María a ti, muchas gracias por haberme facilitado siempre la existencia y el trabajo. Eres como el clip de Word, yo creo que hasta solucionas el error 404 de internet. Fani a ti por ser nuestro nexo de unión con la parte clínica, con la parte administrativa, con la parte directiva, pieza fundamental del grupo de Reuma, gracias por toda la ayuda que nos das. Todos los demás grupos agradeceremos toda la ayuda que me habéis ofrecido, siempre disponibles. Con mención especial a Susana y a Pauliña por facilitarnos la atención y el material necesarios a la hora de realizar los experimentos. Creo que la convivencia, en cualquier lugar, es complicada, y el trabajo en grupo se construye entre todos, por ello, gracias a muchos de vosotros este trabajo se me ha hecho más llevadero. Agradezco el que estuvierais en el momento y el lugar adecuado durante todo este proceso, ya que todos los comentarios y críticas me han permitido conoceros y crecer con vosotros. Me llevo un cachito de cada uno: ONCO, Inflamación, CellCOM, Terapia, Micro...

I would like to thank Arild Rustan for giving me the opportunity to improve my knowledge in cell metabolism and meeting new interesting people in another international lab. I really appreciate you and your lovely personality, which made me feel like home from the first day I met you. Jenny, I don't think I have enough words to describe how grateful I am for all your work, teaching, taking care, worrying, helping and solving problems for me. One of the things I really appreciated from the first day we met is our communication and understanding of each other. I really hope that we will keep in touch with each other regardless of time, country, work or life. I would also like to thank to all the people in the lab for the positive environment, you made it one of the greatest experiences of my life!

Sin amigos la vida en general no va a ningún sitio y a pesar de que estos últimos años se haya impuesto la distancia entre nosotros, y se haya hecho más complicado de lo esperado, me alegro de que forméis parte de diferentes momentos de mi vida. Rakel, gracias por tu ayuda, por tus consejos y por tus críticas, aunque te pienses que ha sido poco, todo ha valido para que yo esté ahora en esta situación, esto también es parte de ti.

Noemi, admiro todo de ti, gracias por cada uno de los detalles que envuelven nuestra relación. Andrea, gracias por dejarme aprender de ti y por estar en el labo, conmigo, juntas. PMCEX, gracias por haber estado ahí todos estos años, nos deseo todo lo mejor a todos y

cada uno de nosotros, creo que realmente nos merecemos verlo. Lucia, llevo fatal el tenerte lejos, qué bien estoy cuando estoy contigo, simplemente gracias por formar parte de mi vida. My love, you are one of the most special persons I have ever met. Thank you for all your attention, your patience, your logic and help. You have been the key during this last period and I really appreciate all the support you have given me. We both know that after this period the future will come and even we are concerned about it, I am pretty sure, with you, everything will be good.

Y, por último, mi familia. Bendito perejil. Por supuesto, nada de esto hubiera tenido sentido si vosotros no hubierais estado ahí día tras día. Creo que no sois conscientes de la importancia que habéis tenido para mi durante toda esta etapa y para que esté donde estoy. Solo espero que todo vuestro esfuerzo, vuestra inversión y vuestro empeño se vea hoy recompensado, devolviéndoos un granito de todo lo que me habéis dado llegando hasta aquí. A pesar de que todo esto es importante para nosotros cuatro, ya que soy, gracias a vosotros tres, he aprendido que solamente es un pasito más, y que lo principal es haberlo disfrutado en cada momento.

*Con un cachito de cada uno de vosotros a mis espaldas,
gracias,*

soy quien soy por todos vosotros.

Andrea

ÍNDICE

Listado de abreviaturas, tablas y figuras.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XVII
PRÓLOGO	1
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	5
OBJETIVO 1	7
INTRODUCCIÓN	9
MATERIAL Y MÉTODOS	15
1.- Generación de células <i>Rho-0</i>	15
2.- Aislamiento y cuantificación de ADN: número de copias de ADNmt	18
3.- Caracterización de células <i>Rho-0</i>	20
4.- Análisis estadístico	26
RESULTADOS	27
1.- Generación de células <i>Rho-0</i> y determinación del número de copias de ADNmt.....	27
2.- Estudio de las células <i>Rho-0</i> generadas	31
DISCUSIÓN	35
OBJETIVO 2	39
INTRODUCCIÓN	41
MATERIAL Y MÉTODOS	47
1.- Generación de híbridos mitocondriales.....	47
2.- Caracterización de híbridos mitocondriales	50
3.- Cultivo celular.....	56
4.- Actividad de la enzima citrato sintasa (CS) y de los complejos de la cadena de transporte electrónico (CTE).....	58
5.- Estado de la red mitocondrial en híbridos	60
6.- Aislamiento de ARN y retrotranscripción a ADNc	63

7.- Expresión génica de enzimas implicadas en la biogénesis mitocondrial...	64
8.- Análisis estadístico	67
RESULTADOS.....	69
1.- Caracterización de cíbridos transmitocondriales	69
2.- Estudio de la morfología celular bajo diferentes condiciones de cultivo...	73
3.- Determinación del crecimiento celular y el TD.....	75
4.- Actividad de la enzima citrato sintasa (CS) y los complejos de la cadena de transporte electrónico (CTE)	78
5.- Estado de la red mitocondrial de los cíbridos	81
DISCUSIÓN.....	89
OBJETIVO 3.....	95
INTRODUCCIÓN.....	97
MATERIAL Y MÉTODOS	101
1.- Estudio de la respiración mitocondrial mediante el análisis de la tasa de consumo de oxígeno (<i>OCR</i>).....	101
2.- Respuesta al estrés oxidativo: técnicas de citometría de flujo	102
3.- Niveles de expresión proteica de marcadores de autofagia.	108
4.- Expresión génica de enzimas implicadas en el metabolismo celular	112
5.- Análisis estadístico	114
RESULTADOS.....	115
1.- Análisis de estatus mitocondrial	115
2.- Análisis del estrés oxidativo	118
3.- Análisis de la apoptosis celular en presencia de un estímulo inflamatorio: IL-1 β	129
4.- Determinación de marcadores de autofagia.....	130
DISCUSIÓN.....	133
OBJETIVO 4.....	143
INTRODUCCIÓN.....	145
MATERIAL Y MÉTODOS	151

1.- Estudio de la glucolisis mediante el análisis de la tasa de acidificación extracelular (<i>ECAR</i>).....	151
2.- Bioquímica celular: consumo de glucosa, producción de lactato y actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....	156
3.- Determinación del metabolismo glucolítico mediante sustratos marcados radioactivamente	159
4.- Estudio comparativo del metabolismo de la glucosa y el de los ácidos grasos mediante sustratos marcados radioactivamente.....	161
5.- Análisis del almacenamiento celular de los principales sustratos metabólicos: glucosa y ácidos grasos.....	166
6.- Expresión génica de enzimas implicadas en el metabolismo glucolítico y lipídico.....	170
7.- Análisis estadístico	170
RESULTADOS.....	173
1.- Estudio de la glucolisis mediante el análisis de la tasa de acidificación extracelular (<i>ECAR</i>).....	173
2.- Bioquímica celular: consumo de glucosa, producción de lactato y actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....	175
3.- Determinación del metabolismo glucolítico mediante sustratos marcados radioactivamente	179
4.- Estudio comparativo del metabolismo de la glucosa y el de los ácidos grasos mediante sustratos marcados radioactivamente.....	184
5.- Análisis del almacenamiento celular de los principales sustratos metabólicos: glucosa y ácidos grasos.....	199
DISCUSIÓN.....	205
OBJETIVO 5.....	217
INTRODUCCIÓN.....	219
MATERIAL Y MÉTODOS	223
1.- Extracción y separación de proteínas a partir de un extracto celular mediante técnicas basadas en gel.....	224
2.- Cuantificación de proteínas mediante tinción de plata y densitometría	225

3.- Preparación y marcaje de proteínas mediante isótopos estables: marcaje <i>iTRAQ</i>	226
4.- Limpieza y separación de péptidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa.....	227
5.- Identificación y cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas	230
6.- Análisis del proteoma.....	230
RESULTADOS.....	235
1.- Identificación de proteínas intracelulares y asociadas a la función mitocondrial	235
2.- Cuantificación relativa y caracterización funcional de proteínas totales.....	238
3.- Análisis de la expresión relativa y función de proteínas asociadas a la mitocondria.....	244
DISCUSIÓN.....	249
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	257
BIBLIOGRAFÍA	263
ANEXOS	285
ANEXO I Consentimiento informado	287
ANEXO II Resultados complementarios.....	289
ANEXO III Artículos establecidos a partir de este trabajo de tesis	335

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
2-DG	2-Deoxiglucosa
Abs	Absorbancia
ACC. N^o	<i>Accession number</i> , número de acceso
ACN	Acetonitrilo
ACP	<i>Acyl-carrier protein</i> , proteína transportadora de aciles
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
AE	Actividad Específica
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i> , proteína quinasa activada por adenosín monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr 12S	ARN ribosómico 12S
AS	Anti Sentido
ASM	<i>Acid-soluble metabolites</i> , metabolitos ácido-solubles
ATP	Adenosintrifosfato
AZT	Zidovudina (3'-acido-3'-deoxitimidina)
BCA	Ácido bicicoínico
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i> , célula B del linfoma 2
BECN1	Beclin 1
BrEt	Bromuro de Etidio (3,8-Diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio bromuro)
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , albumina de suero bovino
CA	<i>Cell associated</i> , radioactividad asociada a célula

Ca⁺⁺	Calcio
CE	Colesterol-éster
CHECK	<i>Cohort Hip and Cohort Knee</i> , cohorte de cadera y cohorte de rodilla
CO₂	Oxidación completa de sustrato marcado radioactivamente
CO₂	Dióxido de carbono
CPT1b	<i>Carnitine palmitoyltransferase-1b</i> , palmitoiltransportador 1b de carnitina
CS	Citrato Sintasa
Ct	<i>Cycle Threshold</i> , ciclo límite
CTE	Cadena de transporte de electrones
d4T	Estavudina (2'-3'-didehidro-2'-3'-dideoxytimidina)
DAG	Diacilglicerol
ddNTP	Didesoxinucleótido
DE	Desviación Estándar
DilC1(5)	<i>1,1',3,3,3'-hexamethylindodicarbo-cyanine iodide</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , medio de águila modificado Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido
DRP1	<i>Dynamic-related protein 1</i> , proteína relacionada con dinámica 1
ECAR	<i>Extracellular acidification rate</i> , tasa de acidificación extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido tetraacético etilenglicol
ERA	Elemento de respuesta antioxidante
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido
FCCP	Carbonilo cianuro-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona
FFA	<i>Free fatty acids</i> , ácidos grasos libres
FIS1	<i>Mitochondrial fission 1 protein</i> , proteína de fisión mitocondrial 1

FITC	Ficoeritrina
FL	Fosfolípidos
FRET	<i>Flourescence resonance energy transfer</i>
FSC	<i>Forward scatter</i> , dispersión frontal
Glu	Glucosa
GO	<i>Gene ontology</i> , ontología génica
gr	Gramos
GWAS	<i>Genome-wide association scans</i> , análisis de asociación de genoma completo
h	Horas
H⁺	Protón
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i> , solución salina tamponada de Hank
HIF1α	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit</i> , factor inducible de hipoxia subunidad 1 alfa
HK2	Hexoquinasa 2
Hoechst 33258	20-(4-metoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-bencimidazol
CHUAC	Centro Hospitalario Universitario de A Coruña
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano
IL-1β	Interleuquina 1 β
iTRAQ	<i>Isotope Tagged Relative and Absolute Quantification</i> , cuantificación relativa y absoluta marcando con isótopos
kDA	Kilodaltons
kV	Kilovoltios
L	Litro
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3</i> , cadena ligera 3 de la proteína 1A/1B asociada a microtúbulos
LD	<i>Lipid droplet</i> , gota lipídica

LD540	4,4-Difluoro-2.3,5.6-bis-tetrametilen-4-bora-3a,4a-diaza-indaceno
LDH	Lactato deshidrogenasa
LHON	<i>Leber's hereditary optic neuropathy</i> , neuropatía óptica hereditaria de Leber
M	Molar
m/z	Masa/carga
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> , ionización láser asistida por matriz
MEC	Matriz extracelular
MFN2	<i>Mitofusin 2</i> , mitofusina 2
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MPC1	<i>Mitochondrial pyruvate Carrier 1</i> , transportador mitocondrial de piruvato 1
MPC2	<i>Mitochondrial pyruvate Carrier 2</i> , transportador mitocondrial de piruvato 2
MPP⁺	1-metil-4-fenilpiridinium
MS	Espectrometría de masas
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> , diana de rapamicina en mamíferos
MW-12	<i>MultiWell-12well</i> , placa de cultivo multipocillo de 12 pocillos
MW-24	<i>MultiWell-24well</i> , placa de cultivo multipocillo de 24 pocillos
MW-6	<i>MultiWell-6well</i> , placa de cultivo multipocillo de 6 pocillos
MW-96	<i>MultiWell-96well</i> , placa de cultivo multipocillo de 96 pocillos
Na₂CO₃	Carbonato potásico
NaCl	Cloruro de sodio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NaOH	Hidróxido de sodio
NaTio	Tiosulfato sódico
NFE2L2	<i>Nuclear Factor Erythroid-Derived 2-Like 2</i> , factor nuclear derivado de eritroides 2-como 2
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
ON	Óxido nítrico
NRF1	<i>Nuclear Respiratory Factor 1</i> , factor respiratorio nuclear 1
O₂	Oxígeno
O₂⁻	Anión superóxido mitocondrial
OA	Osteoartritis o artrosis
OAI	<i>Osteoarthritis initiative</i>
OCR	<i>Oxygen consumption rate</i> , tasa de consumo de oxígeno
OH[·]	Radicales hidroxilo
Ole	Ácido oleico
Oligo	Oligomicina
P	Piruvato
P/E	Penicilina y estreptomicina
PANTHER	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i> , análisis de proteínas a través de relaciones evolutivas
PAS	Ácido periódico-Schiff
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PEG	Polietilenglicol
PGC-1α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha</i> , receptor activado por el proliferador de peroxisomas Gamma, coactivador 1 alfa

PIB	Producto interior bruto
PPR	<i>Proton production rate</i> , tasa de producción de protones
<i>p-rpS6</i>	<i>Ribosomal protein S6 phosphorylated</i> , proteína ribosomal S6 fosforilada
PSA	Persulfato amónico
Rd6g	Rodamina 6g
<i>RNasaP</i>	<i>Ribonuclease P</i> , Ribonucleasa P
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , especies reactivas de oxígeno
Rot/Ant	Rotenona/Antimicina
<i>RP-HPLC</i>	<i>Reverse phase-high performance liquid chromatography</i> , cromatografía líquida de fase reversa
<i>RPL13A</i>	<i>Ribosomal Protein L13a</i> , proteína ribosómica L13a
rpm	Revoluciones por minuto
<i>RT-PCR</i>	<i>Real Time Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
S	Sentido
SAI	Servicio de apoyo a la investigación
<i>SBE</i>	<i>Single Base Extensión</i> , extensión de una sola base
SBF	Suero Bovino Fetal
<i>SDS</i>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecilsulfato sódico
seg	Segundos
<i>SLC2A1</i>	<i>Solute Carrier Family 2 Member 1</i> , miembro 1 de la familia 2 de los transportadores de solutos
<i>SLC2A3</i>	<i>Solute Carrier Family 2 Member 3</i> , miembro 3 de la familia 2 de los transportadores de solutos
<i>SNPs</i>	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> , polimorfismos de un solo nucleótido
<i>SOD2</i>	<i>Superóxido dismutasa mitocondrial 2</i>
SSC	<i>Side scatter</i> , dispersión lateral
<i>STRING</i>	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes</i> , herramienta de búsqueda en la recuperación de genes que interactúan entre si

TA	Temperatura ambiente
TAG	Triacilglicerol
TALENs	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i> , nucleasas efectoras activadoras de la transcripción
TBE	Tampón de Tris-Borato-EDTA
TBST	Tampón salino Tris- <i>Tween</i>
TCA	Ciclo de ácidos tricarboxílicos
TD	Tiempo de Duplicación
TEMED	1 $\mu\text{l/ml}$ de N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TFAM	<i>Transcription Factor A, Mitochondrial</i> , factor A de transcripción mitocondrial
TOF	<i>Time of flight</i> , tiempo de vuelo
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato
TTP	Timidina-5'-trifosfato
U/mL	Unidades/mililitro
WB	<i>Western blot</i>
λ	Longitud de onda
YP	Yoduro de Propidio
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana
μl	Microlitro
μM	Micromolar

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Concentraciones y tiempos de incubación con diferentes compuestos inhibidores de la replicación de ADNmt en las líneas 3a6 y T/C-28a2.....	18
Tabla 2	Secuencia de los cebadores utilizados para la obtención del número de copias de ADNmt.	20
Tabla 3	Parámetros y cálculos realizados a partir de los datos adquiridos tras llevar a cabo el protocolo <i>Cell Mito Stress Test</i> del <i>Seahorse XFp</i>	26
Tabla 4	Descripción de los pacientes seleccionados como donantes de plaquetas para la generación de híbridos transmitocondriales.....	48
Tabla 5	Secuencia de los cebadores utilizados en la <i>PCR</i> múltiple y en el <i>SBE</i> para asignar cada una de las posiciones que definen los haplogrupos de ADNmt europeos. Modificado de Rego <i>et al.</i> , 2008 (98).	52
Tabla 6	Programas de amplificación utilizados durante el desarrollo de la técnica de asignación de haplogrupos de ADNmt.	53
Tabla 7	Secuencia de los cebadores utilizados en la <i>PCR</i> convencional y en la secuenciación para asignar haplogrupos de ADNmt.....	54
Tabla 8	Composición de los medios de cultivo y condiciones de cultivo utilizadas.	56
Tabla 9	Genes analizados mediante expresión génica. Secuencias de los cebadores y sondas correspondientes.	66
Tabla 10	Análisis estadísticos utilizados en cada una de las comparaciones.....	67
Tabla 11	Resultados obtenidos en cada condición de cultivo para cada uno de los puntos de la tasa de crecimiento estudiados.	76
Tabla 12	Lista de anticuerpos empleados en la técnica de <i>WB</i>	111
Tabla 13	Datos obtenidos del estudio de los parámetros de función mitocondrial estudiados y análisis en función de los haplogrupos de ADNmt.	117

Tabla 14 Resultados obtenidos de la producción de O_2^- en presencia de 4,5 gr/L de glucosa en cada condición de cultivo para cada uno de los grupos de estudio.	119
Tabla 15 Resultados obtenidos de la producción de O_2^- en presencia de 1 gr/L de glucosa en cada condición de cultivo para cada uno de los grupos de estudio.	121
Tabla 16 Resultados obtenidos de la producción de O_2^- en el análisis de datos en presencia de 4,5 y 1 gr/L de glucosa en cada condición de cultivo para cada uno de los grupos de estudio.	122
Tabla 17 Características y composición de los medios de cultivo empleados para en este objetivo.	151
Tabla 18 Ecuaciones utilizadas para obtener los parámetros relacionados con la glucólisis.	154
Tabla 19 Análisis estadísticos utilizados en cada una de las comparaciones llevadas a cabo en este objetivo.	171
Tabla 20 Análisis comparativo entre el metabolismo basal de la glucosa y del ácido oleico en híbridos tras 4 h de oxidación con cada sustrato por separado.	189
Tabla 21 Total de proteínas expresadas diferencialmente y relacionadas con la función mitocondrial.	245

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Prevalencia de afectación de la OA de las diferentes articulaciones (en %).	2
Figura 2 Imagen representativa de la definición de la articulación como un órgano.	4
Figura 3 Imágenes de cultivo celular de las líneas 3a6, T/C-28a2 y 143B.TK ⁻	16
Figura 4 Representación esquemática del flujo de trabajo seguido en la realización del ensayo de respiración mitocondrial con <i>Seahorse XFp</i>	22
Figura 5 Representación gráfica de la inhibición de los complejos de la CTE.....	23
Figura 6 Representación gráfica de los valores obtenidos en la determinación del estrés mitocondrial tras la exposición frente a diferentes estímulos.....	24
Figura 7 Número de copias de ADNmt en las líneas 3a6 y T/C-28a2 tras haber sido incubadas en presencia de BrEt.	28
Figura 8 Número de copias de ADNmt en las líneas 3a6 y T/C-28a2 tras haber sido incubadas con diferentes sustancias que deplecionan el genoma mitocondrial.	30
Figura 9 Imágenes de microscopia confocal de la red mitocondrial teñida con MitoTracker® <i>Red</i>	31
Figura 10 Respiración mitocondrial calculada mediante la tasa de consumo de oxígeno (OCR) utilizando un <i>Seahorse XFp</i>	33
Figura 11 Flujo de trabajo seguido para la generación de híbridos transmitocondriales.	49
Figura 12 Electroferograma obtenido tras el haplogrupado de la muestra correspondiente a las 143B.TK ⁻	69
Figura 13 Electroferogramas obtenidos tras el haplogrupado de las muestras.....	70
Figura 14 Representación gráfica de la estabilización del número de copias de ADNmt.	71
Figura 15 Número de copias de ADNmt.	72

Figura 16 Imágenes de microscopía óptica de híbridos tras 48 h de cultivo en diferentes condiciones de cultivo.	74
Figura 17 Imágenes de microscopía óptica de condrocitos tras 48 h de cultivo en diferentes condiciones.	75
Figura 18 Determinación de la actividad específica (AE) de la enzima citrato sintasa (CS).	79
Figura 19 Actividad enzimática (cU) de los complejos de la CTE.	80
Figura 20 Determinación de la masa mitocondrial mediante marcaje con MitoTracker® Red en híbridos.	83
Figura 21 Porcentaje (%) de células positivas para <i>DilC1(5)</i> en relación a su condición basal tras incubarlas con oligomicina (gris), FCCP (amarillo) y estaurosporina (rosa) mediante citometría de flujo.	84
Figura 22 Porcentaje (%) de células despolarizadas tras la incubación con FCCP a 1µM durante 90 min.	85
Figura 23 Expresión génica de enzimas implicadas en la biogénesis mitocondrial.	87
Figura 24 Respuesta al estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂	105
Figura 25 Representación gráfica del patrón obtenido tras marcar las células con Anexina V y yoduro de propidio (YP).	107
Figura 26 Representación de la modulación de la OCR tras la adición de los inhibidores correspondientes.	115
Figura 27 Determinación del estatus mitocondrial de los híbridos N y OA.	116
Figura 28 Determinación del ATP asociado a la fosforilación oxidativa (OXPHOS).	118
Figura 29 Producción de anión superóxido mitocondrial (O ₂ ⁻) en 4,5 gr/L de glucosa en normoxia e hipoxia.	120
Figura 30 Producción de O ₂ ⁻ en 1 gr/L de glucosa sin piruvato en normoxia e hipoxia.	121
Figura 31 Efecto de la concentración de glucosa en el estrés oxidativo.	122

Figura 32 Niveles de la expresión génica relativa de <i>HIF1α</i> en cíbridos crecidos en normoxia e hipoxia.	123
Figura 33 Viabilidad celular representada como porcentaje de células positivas para SYTOX® <i>Green</i> tras haber sido incubadas en H ₂ O ₂ a 300 μ M.	124
Figura 34 Respuesta al estrés oxidativo tras la incubación con menadiona (Mena) en cíbridos N y OA frente con la condición basal (<i>DMEM</i> 4,5+P).....	125
Figura 35 Representación gráfica de la variación de la nube poblacional entre la condición basal y tras incubar las células con menadiona tanto en presencia (+) como ausencia (-) de piruvato.	126
Figura 36 Porcentaje (%) de células marcadas con Anexina-V e YP en presencia (+) y ausencia (-) de piruvato tras ser incubadas con menadiona (M) durante 1 h.	127
Figura 37 Niveles de expresión génica de <i>NFE2L2</i> y <i>SOD2</i> en la respuesta al estrés oxidativo en cíbridos cultivados en ausencia (basal) o presencia de menadiona (M).	128
Figura 38 Análisis de la apoptosis celular en presencia de estaurosporina (2 μ M) durante 2 h o en presencia de IL-1 β (10 ng/ml) durante 48 h.	130
Figura 39 Determinación de marcadores de autofagia mediante <i>WB</i>	131
Figura 40 Determinación de marcadores de autofagia mediante expresión génica.	132
Figura 41 Representación del metabolismo de la glucosa (vías marcadas en rojo) y de los ácidos grasos (vías marcadas en verde) en el interior celular.....	146
Figura 42 Gradiente de difusión del O ₂ y de la disponibilidad de nutrientes desde el espacio interarticular hasta el hueso subcondral a lo largo de las diferentes capas que forman el cartílago articular.	150
Figura 43 Representación gráfica del flujo de trabajo seguido en la realización del ensayo de medición de la tasa de acidificación extracelular (<i>ECAR</i>).	153
Figura 44 Representación gráfica de como los inhibidores modulan la <i>ECAR</i> mediante el aumento o disminución de H ⁺	154

Figura 45	Medición a tiempo real de <i>ECAR</i>	155
Figura 46	Representación esquemática del metabolismo de la glucosa marcada radioactivamente y parámetros evaluados.	160
Figura 47	Representación esquemática del análisis del metabolismo del ácido oleico marcado radioactivamente y los parámetros evaluados.	162
Figura 48	Representación esquemática metabolismo de la glucosa marcada radioactivamente (rojo) en presencia de ácido oleico (gris, ya que en este experimento no está marcado radioactivamente), así como de los parámetros evaluados.	165
Figura 49	Representación esquemática del metabolismo de la glucosa (rojo) y del ácido oleico (verde) al estudiar la flexibilidad metabólica en presencia de inhibidores mitocondriales.	166
Figura 50	Determinación de la capacidad glucolítica de los cíbridos.	174
Figura 51	Determinación de la producción de ATP asociado a la <i>ECAR</i> de los cíbridos.	175
Figura 52	Consumo de glucosa y producción de lactato en cíbridos.	177
Figura 53	Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cíbridos crecidos en <i>DMEM</i> 4,5+P y <i>DMEM</i> 1+P.	178
Figura 54	Determinación de la producción de piruvato y de la expresión génica del transportador de piruvato mitocondrial <i>MPC2</i>	179
Figura 55	Determinación del metabolismo glucolítico en <i>DMEM</i> 4,5+P.	180
Figura 56	Determinación del metabolismo glucolítico en <i>DMEM</i> 1+P.	181
Figura 57	Determinación de la expresión génica de enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa en cíbridos crecidos en <i>DMEM</i> 4,5+P.	182
Figura 58	Determinación de la expresión génica de enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa en cíbridos crecidos en <i>DMEM</i> 1+P.	183
Figura 59	Análisis comparativo de los datos obtenidos el metabolismo glucolítico en <i>DMEM</i> 4,5+P y <i>DMEM</i> 1+P.	184
Figura 60	Incorporación de glucosa durante 24 h.	185

Figura 61 Metabolismo basal del ácido oleico.	186
Figura 62 Incorporación de ácido oleico durante 24 h.	187
Figura 63 Metabolismo basal del ácido oleico. Eficiencia de la β -oxidación tras 4 h de oxidación de este sustrato.	188
Figura 64 Efecto del ácido oleico en el metabolismo de la glucosa.	190
Figura 65 Efecto del ácido oleico en el estrés oxidativo.	192
Figura 66 Flexibilidad metabólica en cíbridos N (claro) y OA (oscuro).	194
Figura 67 Flexibilidad metabólica, análisis por haplogrupos de ADNmt.	196
Figura 68 Representación gráfica de los resultados obtenidos en el análisis de la flexibilidad metabólica mediante el empleo de inhibidores.	197
Figura 69 Análisis del efecto de los inhibidores mitocondriales etomoxir y UK5099 en la respuesta al estrés oxidativo tras 48h en <i>DMEM</i> glu/ole.	198
Figura 70 Determinación de la acumulación de glucosa en el interior celular mediante marcaje <i>PAS</i>	200
Figura 71 Distribución de ácidos grasos en el interior celular y formación de gotas lipídicas (<i>LDs</i>).	203
Figura 72 Determinación de la lipólisis tras 24 h de cultivo sin sustrato marcado radioactivamente.	204
Figura 73 Flujo de trabajo seguido para el marcaje <i>iTRAQ</i> de los cíbridos.	223
Figura 74 Análisis por <i>GO</i> de las 601 proteínas identificadas.	236
Figura 75 Determinación de las proteínas asociadas a la función mitocondrial.	237
Figura 76 Perfil funcional de las proteínas diferencialmente expresadas por los cíbridos N.	239
Figura 77 Perfil funcional de las proteínas diferencialmente expresadas por los cíbridos OA.	240
Figura 78 Perfil funcional de las proteínas diferencialmente expresadas por los cíbridos portadores del haplogrupo de ADNmt H.	242
Figura 79 Perfil funcional de las proteínas diferencialmente expresadas por los cíbridos portadores del haplogrupo de ADNmt J.	243

Figura 80 Análisis por VENNY del conjunto de proteínas expresadas diferencialmente.....244

Figura 81 Análisis por *STRING* de las 11 proteínas expresadas diferencialmente identificadas y relacionadas con la función mitocondrial.245

RESUMEN

La artrosis es una patología compleja que se origina debido a la pérdida del equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos, desencadenando la modificación anatómica y la alteración fisiológica de la función articular. En los últimos años se ha establecido una relación entre la función mitocondrial, su genoma y la incidencia y/o progresión de esta patología. Hoy en día el uso de modelos celulares como los híbridos transmitocondriales que se caracterizan por presentar un mismo fondo nuclear pero diferente genoma mitocondrial, resultan esenciales para estudiar el papel de la mitocondria en patologías complejas como la artrosis.

El objetivo de esta tesis fue la generación de células carentes de genoma mitocondrial, así como la generación de híbridos portadores de los haplogrupos de ADNmt H y J de individuos sanos y artrósicos para analizar de qué manera la función mitocondrial está relacionada con mecanismos que conllevan a la alteración del cartílago articular.

El análisis de parámetros relacionados con el desarrollo de esta patología como el estrés oxidativo, apoptosis, autofagia o el metabolismo glucolítico y lipídico, nos permitió demostrar la relevancia de las mitocondrias funcionales en la fisiopatología de la artrosis. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de diferencias entre los híbridos portadores de diferentes ADN mitocondriales tanto a nivel funcional como molecular.

RESUMO

A artrose é unha patoloxía complexa que se orixina debido á perda do equilibrio entre os procesos anabólicos e catabólicos, desencadeando a modificación anatómica e a alteración fisiolóxica da función articular. Nos últimos anos, estableceuse unha relación entre a función da mitocondria, o seu xenoma e a incidencia e/o progresión de esta patoloxía. Hoxe en día, o uso de modelos celulares como os cíbridos transmitocondriais que caracterízanse por ter o mesmo fondo nuclear pero diferente xenoma mitocondriai, permiten estudar o papel da mitocondria en patoloxías complexas coma a artrose.

O obxectivo desta tese foi a xeración de células carentes de xenoma mitocondriai e a xeración de cíbridos portadores dos haplogrupos H e J de individuos sans e artríticos para analizar de que maneira a función mitocondriai pódese relacionar cos mecanismos que levan á alteración da cartilaxe articular.

A análise de parámetros que relacionáronse có desenvolvemento desta patoloxía coma o estrés oxidábel, apoptose, autofaxia ou o metabolismo da glucosa e dos lípidos, demostrou a relevancia das mitocondrias funcionais na fisiopatoloxía da artrose. Os resultados presentados nesta tese puxeron de manifesto as diferenzas entre os cíbridos orixinados a partir de diferentes xenomas mitocondriais tanto ó nivel funcional coma molecular.

ABSTRACT

Osteoarthritis is a complex disease in which an imbalance between anabolic and catabolic processes leads to the anatomical and physiological alteration of the joint function. During the last years, mitochondrial function and genome have been associated with the incidence and/or progression of osteoarthritis. Nowadays, cell models such as transmitochondrial cybrids, which have the same nuclear background but different mitochondrial genome, are a useful tool to study the role of mitochondria in complex diseases like osteoarthritis.

The aim of this thesis was to generate cells without mitochondrial genome and to establish transmitochondrial cybrids carrying the H and J haplogroups from healthy and osteoarthritic donors. This allowed us to study how the mitochondrial function may be related to mechanisms that initiate molecular alterations at the joint.

Analyzing the parameters that have been related to osteoarthritis development, like oxidative stress, apoptosis, autophagy, glucose and fatty acid metabolism, we could demonstrate the relevance of functional mitochondria in the pathophysiology of osteoarthritis. To conclude, the results presented in this thesis showed that cybrids carrying different mitochondria genomes responded differently at functional and molecular levels.

PRÓLOGO

Hipótesis y objetivos.

PRÓLOGO

Actualmente, la osteoartritis (OA), comúnmente conocida como artrosis, es una de las enfermedades musculoesqueléticas más comunes a nivel mundial, estimándose que aproximadamente un total de 250 millones de personas en todo el mundo la padecen. Dentro de esta enfermedad, la más común es la OA de rodilla ya que alrededor del 85% de casos se relacionan con esta articulación (1, 2). En Europa se estima que alrededor de 40 millones de personas la padecen (3). Al analizar la incidencia de la OA de rodilla en la población mayor de 50 años, se estima que un 20% de las mujeres y un 10% de los hombres presentan signos radiográficos de OA de rodilla (1, 4).

En España, según el Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e Igualdad y el Instituto Nacional de Estadística, la OA es considerada una de las patologías crónicas más prevalentes por delante de las enfermedades cardíacas y respiratorias. El último estudio de prevalencia de las enfermedades reumáticas en la población adulta española (EPISER-2016), llevado a cabo por la Sociedad Española de Reumatología, reflejó que la OA presenta diferente prevalencia en función de la articulación, así la OA de rodilla presenta una prevalencia del 13,83% (Figura 1). Por su parte, en el año 2014, el Instituto Nacional de Estadística describió que alrededor del 11,1% de los hombres y el 25,1% de las mujeres mayores de 15 años presentaban OA. En la comunidad gallega, según datos de la Liga Reumatológica Galega, el 23% de la población padece algún síntoma relacionado con enfermedades reumáticas, viéndose afectados aproximadamente un total de 600.000 gallegos, lo que aumenta la prevalencia de esta patología hasta un 95% en personas mayores de 65 años. Teniendo en cuenta los datos descritos, y que la pirámide poblacional se está invirtiendo debido al envejecimiento de la población a nivel mundial, en los próximos años se espera que estos porcentajes aumenten notablemente.

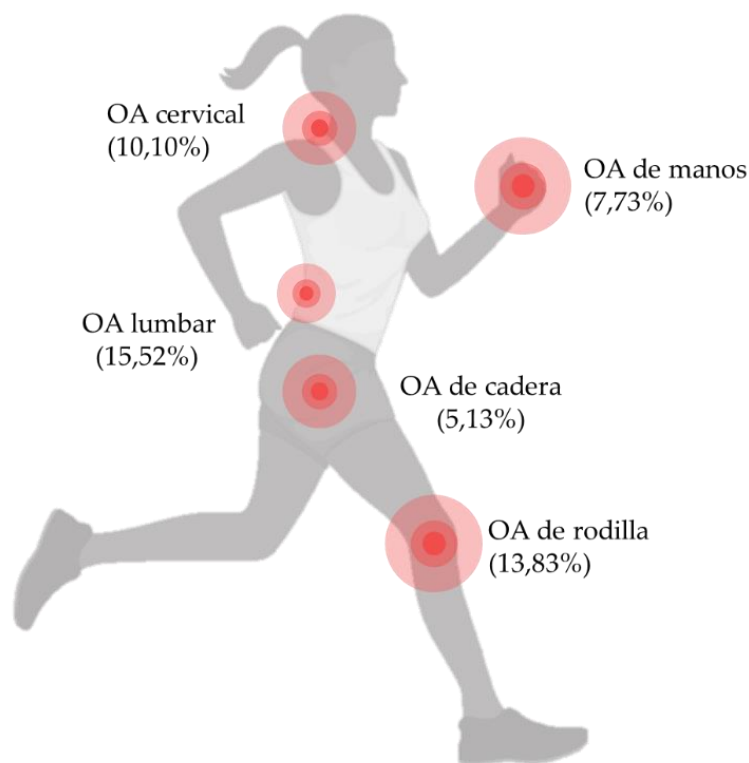


Figura 1 Prevalencia de afectación de la OA de las diferentes articulaciones (en %). Datos obtenidos del estudio EPISER 2016.

Si bien esta patología no es mortal, si es altamente incapacitante para la persona que la padece, siendo la enfermedad que provoca más discapacidad en los mayores en comparación con cualquier otra enfermedad. Entre sus principales características destacan el dolor y la falta de movilidad asociados a la destrucción de la articulación, lo que provoca una pérdida de la función motora y afecta al nivel de trabajo de los individuos que lo padecen, disminuyendo significativamente su calidad de vida (3, 5, 6). Hoy en día, esta patología no tiene cura y por tanto los facultativos únicamente pueden paliar los síntomas de los pacientes. En último lugar, se plantea la cirugía de reemplazo articular como abordaje terapéutico para que el paciente pueda recuperar su calidad de vida, siendo esto una de las soluciones más costosas (1). Esta situación (de falta de un tratamiento eficaz que frene el deterioro articular) y el gran número de bajas médicas asociadas, son los

dos factores que incrementan en gran medida el coste de esta patología a las arcas del estado (7). En consecuencia, el coste médico y, por tanto, el impacto socioeconómico de la OA es muy elevado traduciéndose en aproximadamente el 1-2,5% del producto interior bruto de un país (3, 6). En España, supone un gran gasto socio-sanitario tanto a nivel del Sistema Nacional de Salud como para el sector profesional y empresarial, constituyendo el 0,5% del PIB nacional, llegando a alcanzar un coste de 5 millones de euros anuales (5).

A día de hoy, la OA es considerada una patología que afecta al conjunto de las articulaciones móviles, donde se producen cambios a nivel molecular que originan estrés celular y degradación de la matriz extracelular y activan respuestas de reparación ineficientes, las cuales pueden favorecer vías inflamatorias (1). Es una enfermedad compleja en la que se desencadenan cambios moleculares que llevan a la modificación anatómica y fisiológica de la función articular culminando en síntomas visibles en el paciente como el dolor o la rigidez en la articulación (8). En los últimos años, se ha pasado a considerar a la articulación como un órgano donde todas sus estructuras juegan un papel fundamental en el mantenimiento de su correcta función. Por ello, una articulación artrósica difiere de la de una normal por presentar degradación del cartílago, remodelación del hueso subcondral, formación de osteofitos, inflamación de la membrana sinovial y del tejido de sostén como ligamentos, tendones y músculo (5) (Figura 2). Todas estas estructuras están intercomunicadas e interactúan de una u otra manera, por lo que el estudio de la OA no puede centrarse únicamente en el cartílago si no que debe llevarse a cabo teniendo en cuenta todos los procesos y estructuras que lo rodean.

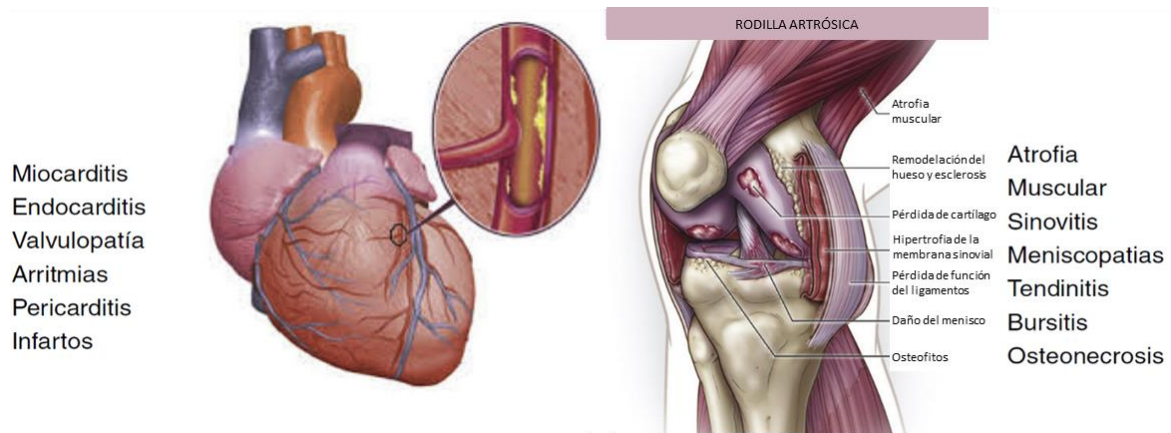


Figura 2 Imagen representativa de la definición de la articulación como un órgano. En esta imagen se describen todos los tejidos que lo componen en comparación con un órgano estándar como es el corazón. Aparecen reflejadas las patologías que pueden afectar a los tejidos que componen cada uno de los órganos que, como fin último, generan un fallo orgánico. Imagen obtenida y modificada de Blanco *et al.*, 2018 (5).

Actualmente no existe ni un método de diagnóstico precoz ni un tratamiento eficaz que permita detener o revertir la degradación de la articulación, además de técnicas que nos permitan descifrar el complejo origen fisiopatológico de esta patología ya que son numerosos los factores que intervienen. Así, es de gran relevancia en la investigación básica abordar el estudio de patologías complejas como la OA, tanto a la hora de desarrollar nuevos tratamientos y búsquedas de biomarcadores diagnóstico y/o pronóstico, como del perfeccionamiento de modelos *in vitro* que permitan conocer más en detalle a nivel celular y molecular estas patologías. Pese a que todos estos ensayos son estudios con un alto coste, cuyos resultados se obtienen tras varios años de investigación y trabajo, en los últimos años se está avanzando en el análisis de los procesos que conllevan a la degradación y alteración de la estructura articular. El principal objetivo de estos estudios es lograr definir distintos fenotipos artrósicos y biomarcadores asociados, proporcionando y generando nuevo conocimiento que, a nivel clínico, podrá ser trasladado al paciente, siendo el último beneficiario de los nuevos descubrimientos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que la OA es una enfermedad multifactorial donde la función mitocondrial parece jugar un papel importante en su desarrollo, se ha planteado la siguiente hipótesis de trabajo: “*los cíbridos transmitocondriales son un buen modelo celular para estudiar el papel de la mitocondria en la artrosis*”. A partir de esta hipótesis se han planteado los siguientes objetivos para llevar a cabo el desarrollo de la presente tesis doctoral:

1 Generación y caracterización de células *Rho-0* a partir de diferentes líneas celulares:

1.1 Analizar el efecto de diferentes sustancias con capacidad de deplecionar el ADNmt.

1.2 Caracterización de la función mitocondrial en las líneas *Rho-0* generadas.

2 Generación y caracterización de un modelo *in vitro* de cíbridos transmitocondriales:

2.1 Generación de cíbridos transmitocondriales a partir de plaquetas de donantes sanos y pacientes artrósicos portadores de los haplogrupos de ADNmt H o J.

2.2 Caracterización del modelo *in vitro* bajo diferentes condiciones de cultivo:

2.2.1 Estudio de la morfología y tasa de duplicación celular.

2.2.2 Evaluación de la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

2.2.3 Estudio del estado de la red mitocondrial.

3 Respuesta al estrés oxidativo, apoptosis y autofagia en los cíbridos transmitocondriales:

3.1 Determinación de la función mitocondrial mediante el análisis de la tasa de consumo de oxígeno (OCR).

3.2 Estudio de la respuesta al estrés oxidativo.

3.3 Análisis de la respuesta apoptótica celular.

3.4 Estudio del proceso de autofagia.

4 Análisis del estatus metabólico del modelo celular generado:

4.1 Determinación de la función glucolítica mediante el análisis de la tasa de acidificación extracelular (*ECAR*).

4.2 Bioquímica celular.

4.3 Estudio comparativo del metabolismo de la glucosa y el de los ácidos grasos.

4.4 Análisis del almacenamiento de glucosa y ácidos grasos.

5 Proteoma de los híbridos con marcaje isotópico para cuantificación relativa y absoluta (*iTRAQ*):

5.1 Proteoma celular.

5.2 Proteoma mitocondrial.

OBJETIVO 1

Generación y caracterización de células *Rho-0* a partir de diferentes líneas celulares.

Objetivo 1

Una línea *Rho-0* presenta como principal característica la carencia de ADN mitocondrial (ADNmt) pero no de mitocondrias. La ausencia de este genoma se logra tras la incubación de las células con diversas sustancias que, por diferentes vías, inhiben la replicación del ADNmt (9, 10). Así, tras sucesivos procesos de fusión y fisión, las nuevas mitocondrias generadas van perdiendo el ADNmt. Durante el proceso de obtención de una línea celular *Rho-0*, es esencial conseguir un equilibrio entre la depleción del número de copias de ADNmt y la viabilidad celular.

La generación de este tipo de células se realiza clásicamente en presencia de bajas dosis de Bromuro de Etidio (BrEt) durante un periodo largo de cultivo. Este compuesto presenta una alta capacidad intercalante entre la doble cadena de ADNmt que inhibe la función metabólica de la polimerasa- γ , enzima implicada en el proceso de replicación del genoma mitocondrial. Sin embargo, su uso genera toxicidad y mutaciones en las células debido a su alto grado de capacidad mutagénica, actuando como agente intercalante en el ADN nuclear (ADNn) (11). A pesar de ello, el empleo de este tipo celular despertó y despierta interés ya que se considera importante tanto a la hora de investigar las interacciones núcleo-mitocondria, como los mecanismos patogénicos moleculares que las mutaciones de ADNmt puedan causar (12).

Ya desde hace más de cuatro décadas, cuando se demostró que bajas dosis de BrEt permitían la generación de células *Rho-0* (13), se ha incrementado el número de estudios en este campo, no solo avanzando en testar diversos compuestos que presenten la misma capacidad, sino que también en el empleo de estas células de manera complementaria en numerosas investigaciones. En consecuencia, la manipulación del ADNmt de una célula, el traslado de las mitocondrias de un

Objetivo 1

entorno celular a otro o la posibilidad de introducir nuevos genes en el ADNmt, abre nuevas y numerosas líneas de investigación.

Así, en los últimos años, se han descrito numerosos métodos que permitieron deplecionar el ADNmt tanto en células humanas (9), como de otras especies (14). En concreto, cabe destacar el uso de 2',3' dideoxycytidina (análogo de nucleótidos antivirales que inhiben la replicación) para crear fibroblastos *Rho-0* (15) o del ditercalinium (agente antitumoral intercalante) para la obtención de células *Rho-0* a partir de ratón (16). A partir del 2015, se comenzó a utilizar un método de obtención de células *Rho-0* donde no se usaban compuestos químicos, sino que se basaba en la modificación de enzimas de restricción para fragmentar las moléculas de ADNmt, lo que facilitaría su degradación por parte de endonucleasas mitocondriales, logrando así la depleción del genoma mitocondrial (17).

En este escenario, teniendo la posibilidad de alterar o modificar el genoma mitocondrial, destacó una metodología desarrollada con el objetivo de variar el porcentaje de mutaciones en heteroplasmia características del ADNmt y relacionadas con numerosas patologías (18). La heteroplasmia es un fenómeno conocido a nivel mitocondrial debido a que una célula puede tener diferente porcentaje de variación del ADNmt (variante no mutada y variante mutada) constituyendo una mezcla de dos genotipos mitocondriales diferentes en una misma célula (19). Así, en el 2001 se describió un procedimiento cuyo objetivo fue reducir el porcentaje de variación del ADNmt empleando enzimas de restricción que fragmentaban las moléculas de ADNmt cuyo sitio de restricción específico se había originado por la mutación a estudio (20). Más tarde, mediante el uso de *transcription activator-like effector nucleases (TALENs)*, cuyo origen reside en la reprogramación de enzimas de restricción, Bacman y colaboradores lograron el marcaje y la eliminación de forma permanente de la molécula de ADNmt portadora de mutaciones puntuales, disminuyendo, por tanto, los niveles de

Objetivo 1

heteroplasma mitocondrial (21). En el último año, en este mismo campo, la eficiencia de una técnica basada en el empleo de *mitochondrial zinc-finger nucleases* (*mtZFNs*) modificados para dirigirse directamente al ADNmt, se ha testado en un modelo murino *in vivo* que logró reducir los niveles de ADNmt mutado (22). Del mismo modo, el desarrollo de nuevas técnicas para editar el genoma nuclear, como la tecnología CRISPR-Cas, abrió una nueva ventana para su aplicabilidad en el ADNmt generando una variante denominada spCas9Mito (23).

El proceso de depleción del ADNmt origina células carentes de este genoma, pero dependientes de uridina y piruvato. Esta dependencia de uridina ocurre porque, a medida que el material genético mitocondrial se va eliminando, las células no presentan un correcto funcionamiento de la lanzadera de orato debido a la inhibición de la enzima dihidroorato deshidrogenasa (DHODH), cuya principal función es la biosíntesis de bases púricas (24). La producción de piruvato a través de la glucólisis y la respiración mitocondrial incrementan los niveles de NADH y NAD⁺, respectivamente, en condiciones normales. Cuando se disminuye el contenido del ADNmt, la producción de NAD⁺ se ve afectada, por lo que se produce un desajuste del ratio NADH:NAD⁺, influyendo en la obtención de energía mediante la glucólisis. Por ello, es importante el suplemento de piruvato en el medio de cultivo, puesto que favorece la formación de lactato, generando NAD⁺ y reestableciendo el estatus fisiológico celular (9, 12).

Las células *Rho-0* se han utilizado como un modelo celular para monitorizar aquellas alteraciones en el metabolismo energético en respuesta a la deficiencia en el ADNmt (25, 26). Además, en los últimos años, han cobrado relevancia como una herramienta útil a la hora de estudiar enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial. Estas células forman parte (como donadores de ADNn) del primer paso en la generación de un modelo celular denominado híbridos transmitocondriales. Los híbridos presentan la posibilidad de estudiar el efecto de

Objetivo 1

diferentes genomas mitocondriales bajo el mismo fondo nuclear (ADNn de células *Rho-0*) (9, 10, 27). Muchas de las funciones mitocondriales están controladas por ambos genomas, por ello, las células *Rho-0* y los híbridos son útiles a la hora de identificar cuál de los genomas es el responsable de un defecto mitocondrial concreto.

Los últimos estudios llevados a cabo en el desarrollo de células *Rho-0* se han centrado en deplecionar el ADNmt a partir de nuevas líneas celulares. Esto nos permite abrir el abanico de posibilidades en la investigación de enfermedades donde la mitocondria juega un papel importante, aportando un mayor número de donantes nucleares para la posterior generación de híbridos que presenten una mayor similitud con la patología a estudio en cada caso. En general, las líneas utilizadas en los últimos 10 años para llevar a cabo este objetivo se obtuvieron a partir de líneas celulares tumorales (9). A pesar de su amplia utilización, este tipo de líneas celulares suelen presentar un contaje cromosómico desequilibrado manifestando aneuploidía lo que puede generar pérdida, ganancia y/o translocación de material genético y afectar a la relación ADNn-ADNmt (28, 29). Además, el origen de estas líneas celulares es generalmente anaeróbico y, a pesar de que se desconoce el efecto que este fenotipo puede estar causando en el genotipo mitocondrial, se debería tener en cuenta que podría haber diferencias en comparación con líneas *Rho-0* originadas a partir de un tipo celular con un metabolismo aeróbico (9).

Pese a todo lo descrito anteriormente, las técnicas de obtención de células *Rho-0* descritas actualmente presentan desventajas en forma de efectos mutagénicos o de inducción de la expresión de genes de resistencia a múltiples drogas, lo cual revoca el efecto en la replicación del ADNmt (11). Debido a estos inconvenientes, resulta de gran interés el desarrollo de nuevos protocolos para la generación de células *Rho-0*.

Objetivo 1

Por todo ello, en la primera parte de este trabajo de tesis doctoral, nos centramos en la generación de células *Rho-0* a partir de dos tipos de líneas celulares diferentes a las normalmente utilizadas: una línea de células madre estromales humanas (3a6) y de una línea inmortalizada de condrocitos (T/C-28a2).

Objetivo 1

1.- Generación de células *Rho-0*

1.1 Líneas celulares empleadas:

- **3a6**: línea de células madre estromales humanas cedida por el grupo del Dr. Hung (*Veteran's General Hospital, Taipei*). Se desarrolló a partir de la línea celular KP, que se obtuvo mediante células madre mesenquimales de médula ósea aspiradas de una paciente de 61 años de edad y se inmortalizaron con un vector de transducción retroviral que expresaba HPV16 E6/E7. Finalmente, se transfectaron con *phTERT-IRES2-EGFP*, obteniéndose las 3a6 (30) (Figura 3).
- **T/C-28a2**: línea celular cedida por el grupo de la Dra. Goldring (*HSS Research Institute, EEUU*). Se estableció mediante transfección de cultivos primarios (día 5) de condrocitos obtenidos a partir del cartílago costal de una adolescente de 15 años. La transfección se realizó con un vector retroviral que expresa el antígeno viral *SV40 large T* (31) (Figura 3).
- **143B.TK**: línea celular tumoral de osteosarcoma timidín-quinasa negativa resistente a bromodeoxiuridina (nucleótido sintético análogo a la timidina) adquirida de la colección europea de cultivos celulares (*European Collection of Cell Cultures-ECACC, Public Health England*). Estas células fueron obtenidas a partir de un osteosarcoma de una adolescente caucásica de 13 años (Figura 3).
- **143B.TK-*Rho-0***: células cedidas por el grupo del Dr. Garesse (*IIB-CSIC-UAM, España*). Se generaron a partir de las 143B.TK al incubar estas células con bajas concentraciones de BrEt durante al menos 8 semanas de cultivo.

Las líneas 143B.TK y 143B.TK-*Rho-0* fueron utilizadas como control en los experimentos llevados a cabo para la depleción del ADNmt. La línea

Objetivo 1

143B.TK- *Rho-0* se utilizó como control positivo a la hora de considerar a las dos líneas celulares descritas anteriormente (3a6 y T/C-28a2) como *Rho-0*.

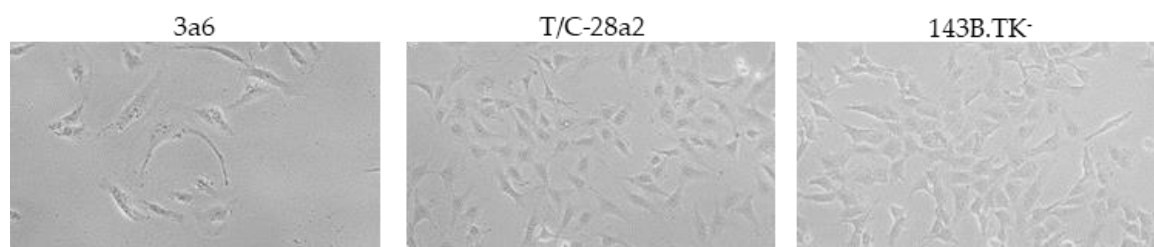


Figura 3 Imágenes de cultivo celular de las líneas 3a6, T/C-28a2 y 143B.TK-. Magnificación de 100.

1.2 Cultivo celular

Las células se crecieron en incubadores a 37°C, 5% de dióxido de carbono (CO₂) y humedad a saturación hasta que alcanzaron el 80% de confluencia en cada uno de los medios de cultivo que se describen a continuación:

- La línea celular 3a6 se expandió en *Dulbecco's modified Eagle's medium Low glucose (DMEM-LG, Thermo Fisher Scientific)* 1 gr/L de glucosa, 1 mM de piruvato sódico, suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) (P/E) (GIBCO) y 2 mM de L-Glutamina (Glutamax, GIBCO).
- Las líneas celulares T/C-28a2 y 143B.TK- se expandieron en *DMEM* 4,5 gr/L glucosa, 1 mM de piruvato sódico y 4 mM de glutamina, suplementado con 10% de SBF y P/E.
- Las líneas celulares *Rho-0* generadas se expandieron en su medio de cultivo correspondiente (bien *DMEM* 1 gr/L de glucosa para las 3a6, o bien, *DMEM* 4,5 gr/L de glucosa para las T/C-28a2 y 143B.TK-) y se suplementaron, en todos los casos, con uridina a 50 mg/ml (Sigma-Aldrich).

Objetivo 1

1.3 Generación de células *Rho-0*

Con el objetivo de testar diferentes sustancias con capacidad de deplecionar el ADNmt permitiendo así obtener células *Rho-0*, se seleccionaron las siguientes sustancias citadas a continuación:

- **BrEt** (3,8-Diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio bromuro) (Sigma-Aldrich): inhibe la función metabólica de enzimas implicadas en la maquinaria de replicación como es el caso de la polimerasa- γ , enzima encargada de la replicación del ADNmt (11).
- **Rd6g** (Rodamina 6g) (Sigma-Aldrich): presenta, entre otras características, la capacidad de inhibir la fosforilación oxidativa mitocondrial y la producción de ATP por acumulación de calcio (Ca^{++}) (32).
- **MPP⁺** (1-metil-4-fenilpiridinio) (Sigma-Aldrich): neurotoxina que actúa interfiriendo en la fosforilación oxidativa, inhibiendo el complejo I de la cadena de transporte electrónico (CTE), lo que genera una disminución drástica en los niveles de producción de ATP en las células. Se ha descrito también que inhibe la replicación del ADNmt al incorporar 5-bromo-20-doxiuridina lo que genera una disminución del número de transcritos mitocondriales (33).
- **AZT** (3'-ácido-3'-deoxytimidina, zidovudina) y **d4T** (2'-3'-didehidro-2'-3'-dideoxytimidina, estavudina) (Sigma-Aldrich): ambas sustancias pertenecen a un grupo de drogas utilizadas en el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana y que se han asociado con procesos de lipodistrofia. Estas dos moléculas pertenecen a la familia de los análogos de los nucleótidos antivirales que inhiben la polimerasa- γ (34). El AZT inhibe la fosforilación oxidativa y rompe el equilibrio entre el timidin-5'-fosfato (TTP) y los demás desoxinucleótidos. El d4t tiene una actividad más tóxica sobre la polimerasa- γ (35-37).

Objetivo 1

Para deplecionar el ADNmt en las líneas celulares, se sembraron un total de 8×10^4 células por pocillo en placa con 6 pocillos (*multiWell plate- MW6*) (Corning Incorporated). Tras 24 h de cultivo, se añadió el medio de cultivo suplementado con uridina y las drogas anteriormente descritas siguiendo las concentraciones y los tiempos recogidos en la Tabla 1. En todos los experimentos, se utilizaron como control células cultivadas en ausencia de las drogas (condición basal) para determinar el nivel de ADNmt en cada tipo celular.

Tabla 1 Concentraciones y tiempos de incubación con diferentes compuestos inhibidores de la replicación de ADNmt en las líneas 3a6 y T/C-28a2.

SUSTANCIA	CONCENTRACIONES	HORAS
<i>Bromuro de etidio (BrEt)</i>	500 nM, 100 nM, 1 mM	240
<i>Rodamina-6g (Rd6g)</i>	1 µg/ml, 3 µg/ml, 5 µg/ml	24±168
<i>1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺)</i>	25 µM, 0,5 mM, 1 mM	72
<i>Stavudina (D4t)</i>	5 µM, 10 µM, 100 µM, 0,5 mM	96±312
<i>Zidovudina (Azt)</i>	10 µM, 20 µM, 0,5 mM	96±216

2.- Aislamiento y cuantificación de ADN: número de copias de ADNmt

2.1 Aislamiento ADN

La extracción de ADN total se llevó a cabo a partir de precipitado celular utilizando el kit *Spin Tissue Mini* (Invisorb®) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se lisaron las células con 400 µl de tampón de lisis G y 40 µl de proteinasa K durante una incubación de 10 minutos (min) a 52°C. A continuación, se añadieron 200 µl de tampón de unión A y se transfirió la mezcla a la columna suministrada por la casa comercial. Posteriormente, se centrifugó durante 3 min a 12000 revoluciones por minuto (rpm) para llevar a cabo la fijación del ADN a la membrana. Para eliminar los restos de proteínas, se realizaron dos lavados con

Objetivo 1

550 μ l de tampón de lavado y se centrifugó durante 1 min a 11000 rpm y 4 min a 14000 rpm, respectivamente, para eliminar los restos de etanol presente en el tampón de lavado. Por último, el ADN se obtuvo a través de la elución con 50 μ l de tampón de elución precalentado a 52°C y posterior centrifugación de 1 min a 11000 rpm.

2.2 Cuantificación ADN

Para llevar a cabo la cuantificación de los ácidos nucleicos se utilizó el Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific) que permite conocer la concentración (ng/ μ l), así como la integridad y pureza de las moléculas de interés mediante espectrofotometría.

La longitud de onda (λ) utilizada para la cuantificación del ADN fue de 260 nanómetros (nm). La integridad se determinó mediante el ratio 260/280 ($A_{260/280}$), cuyo valor $\leq 1,5$ resulta de una contaminación con restos celulares y/o proteínas, y la pureza de cada muestra se estimó con el ratio 230/260 ($A_{230/260}$), cuyo valor $\leq 1,5$ revela contaminación por compuestos de tipo fenólico presente en el proceso de extracción.

2.3 Número de copias de ADN mitocondrial

La cuantificación del número de copias de ADNmt se realizó mediante amplificación del ADN a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*polymerase chain reaction- PCR*) a tiempo real (*real time-polymerase chain reaction- RT-PCR*) y el establecimiento de una relación entre el número de copias de un gen mitocondrial y un gen nuclear de copia única. Para desarrollar el presente trabajo, se seleccionó el ARN ribosómico 12S (ARNr 12S), como gen mitocondrial y, la Ribonucleasa P (RNasaP), como gen nuclear (en la Tabla 2 se describen las secuencias de los cebadores empleados).

Objetivo 1

Tabla 2 Secuencia de los cebadores utilizados para la obtención del número de copias de ADNmt.

<i>ARNr 12S</i>	S	5'-CCA CGG GAA ACA GCA GTG AT-3'
	AS	5'-CTA TTG ACT TGG GTT AAT CGT GTG A-3'
<i>RNaseP</i>	S	5'-GCA CTG AGC ACG TTG AGA GA-3'
	AS	5'-CCA GTC GAA GAG CTC CAG A-3'

S: sentido. AS: anti sentido

En un *LightCycler*® 480 II (Roche) se amplificaron 50 ng de ADN total de cada muestra por duplicado en un volumen final de reacción de 20 µl que incluían: 10 µl de *LightCycler*® 480 *Sybr Green I Master* (Roche) y 0,3 µM de cada cebador completando con agua (H₂O) hasta el volumen final de reacción. La amplificación se llevó a cabo a través de una desnaturalización a 95°C durante 10 min y 50 ciclos que consistieron en: 95°C durante 10 seg, 60°C durante 15 seg y 72°C durante 10 seg; con una extensión final de 72°C durante 1 min.

Los valores de *Ct* (*Cycle Threshold*) obtenidos en cada una de las muestras se extrapolaron a los datos de una curva estándar externa diseñada de manera previa con el objetivo de conocer la concentración de cada uno de los genes. Una vez obtenidos los valores para cada uno de los genes, se calculó el número de copias de ADNmt a través del ratio: *ARNr12S/RNaseP*. Se estableció el contenido de ADNmt de las células control (células sin tratamiento) como el 100% con el objetivo de normalizar los valores obtenidos en cada uno de los experimentos.

3.- Caracterización de células *Rho-0*

3.1 Estado morfológico de la red mitocondrial en células *Rho-0*: tinción con *MitoTracker*® *Red*

La descripción morfológica de la red mitocondrial de las células, tanto control, como con el ADNmt deplecionado, se realizó utilizando el fluoróforo *MitoTracker*® *Red Mitochondrion-Selective Probes* (Thermo Fisher Scientific).

Objetivo 1

El MitoTracker® *Red* es un fluoróforo que difunde pasivamente a través de las membranas celulares y se acumula en la red mitocondrial de las células vivas en función del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Debido a esta característica, se puede utilizar también como medida indirecta de este parámetro.

Brevemente, se sembraron 1×10^4 células por pocillo en portaobjetos multipocillo (Thermo Fisher Scientific) de cuatro pocillos. Tras 48 h de crecimiento, las células se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline- PBS*) y se incubaron con MitoTracker® *Red* a una concentración final de 250 nM durante 30 min en oscuridad a 37°C. A continuación, la preparación se lavó nuevamente con *PBS* y se fijaron las células con Paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4%, previamente atemperado, durante 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se lavó con suero salino tres veces y se realizó la tinción nuclear con 20-(4-metoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-bencimidazol diclorhidrato (Hoechst 33258, Sigma-Aldrich). Este compuesto se une directamente a las regiones de adenina-timina, lo que permite el marcaje nuclear. Se utilizó a una dilución 1:10.000 en *PBS* incubándolo durante 5 min a TA y en oscuridad. Por último, tras lavar con *PBS*, se efectuó el montaje con *ProLong™ Gold Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific) para, posteriormente, realizar las imágenes en el microscopio confocal *Nikon, AR-1* en los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de la Coruña y en el microscopio de fluorescencia Olympus, BX-61.

3.2 Determinación del consumo de oxígeno: Respiración mitocondrial

La tasa de consumo de oxígeno (*oxygen consumption rate- OCR*) como un indicador de la respiración mitocondrial, se evaluó mediante el uso de un *Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies).

Objetivo 1

Con el fin de estudiar la función mitocondrial se utilizó el kit *XFp Cell Mito Stress Test* (Seahorse Bioscience) midiendo de manera directa el OCR mediante el uso de moduladores de la CTE de manera secuencial. Para ello, siguiendo las instrucciones detalladas en la Figura 4, se sembraron 2×10^4 células por pocillo en una placa de cultivo de ocho pocillos (*cell culture miniplates 8 wells XFp Agilent Seahorse XFp*). Tras 24 h, las células se incubaron en el medio de cultivo específico (*XFp Base Medium*) suplementado con glucosa a una concentración de 10 mM, piruvato sódico a 1 mM y glutamina a 2 mM, durante 1 h en estufa de cultivo a 37°C sin CO₂ con el propósito de eliminar el oxígeno residual. Durante la noche previa a la realización del experimento, se hidrataron los sensores de detección del capuchón utilizando el medio específico de calibración denominado *XFp Calibrant* y se incubó en estufa de cultivo a 37°C sin CO₂.

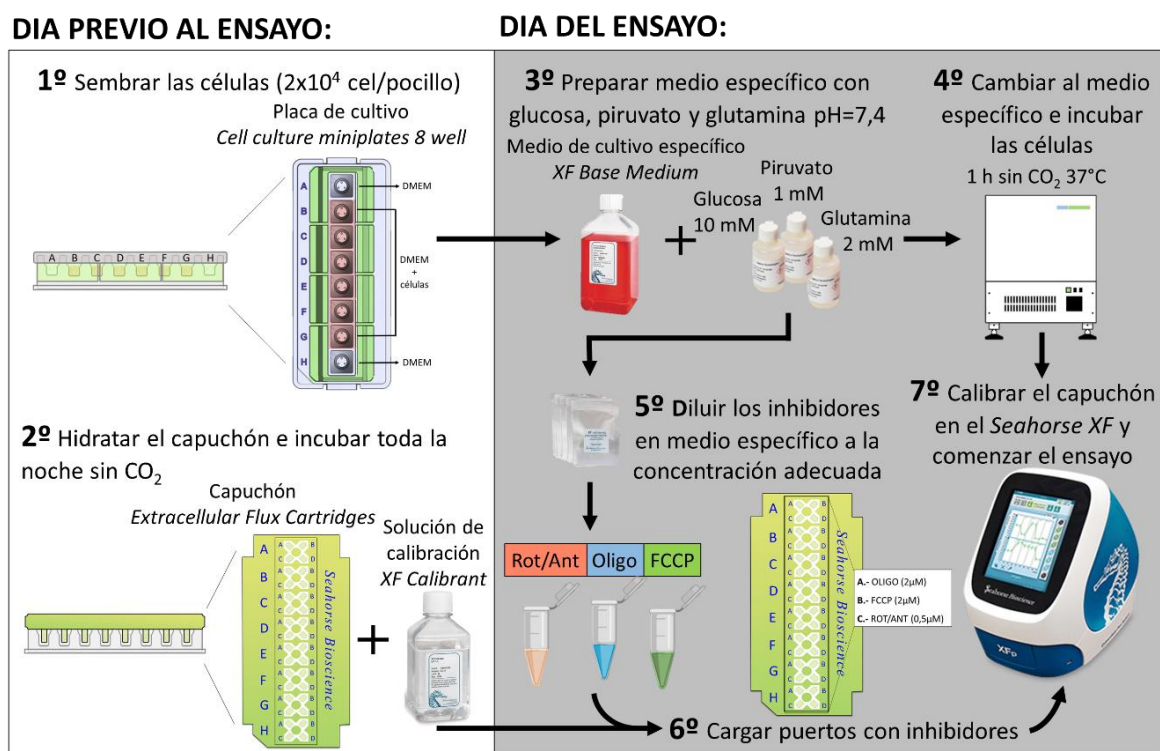


Figura 4 Representación esquemática del flujo de trabajo seguido en la realización del ensayo de respiración mitocondrial con *Seahorse XFp*. Cel: célula. Rot/Ant: rotenona/antimicina. Oligo: oligomicina.

Objetivo 1

Tras este periodo se cargaron los inhibidores en cada uno de los puertos, como se describe a continuación (Figura 5):

- **Puerto A:** oligomicina (Oligo) a una concentración de 2 μM : inhibe la función de la ATP sintasa (complejo V de la CTE) y el valor obtenido mostrará la respiración mitocondrial asociada a la producción de ATP.
- **Puerto B:** carbonilo cianuro-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) a una concentración de 1 μM : este compuesto provoca el colapso del gradiente de protones (H^+) y rompe el $\Delta\Psi\text{m}$ lo que permite medir el consumo máximo de oxígeno.
- **Puerto C:** mezcla de Rotenona/Antimicina A (Rot/Ant) a una concentración de 2 μM y 4 μM respectivamente: estas sustancias son inhibidores del complejo I y III de la CTE, respectivamente, por lo que su adición en el paso final permite el bloqueo total de la CTE facilitando la medida de la respiración celular debida a diferentes procesos no relacionados con la mitocondria.

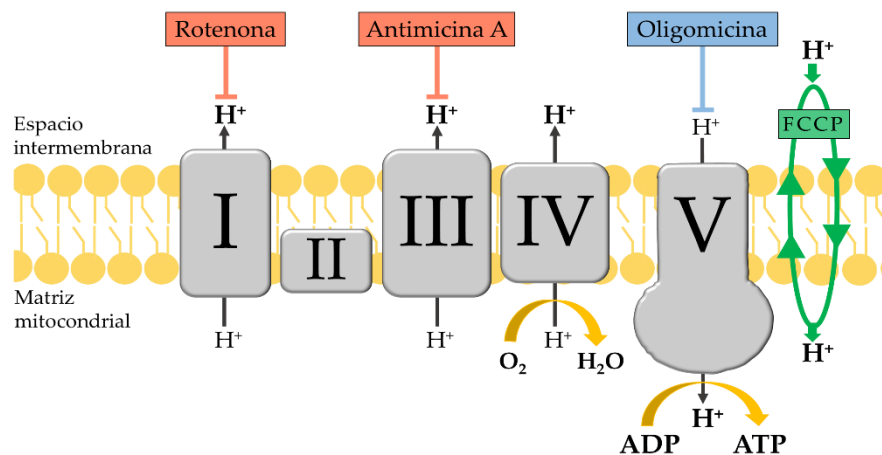


Figura 5 Representación gráfica de la inhibición de los complejos de la CTE. Efecto de los reactivos inyectados a lo largo de la determinación de la respiración celular.

Finalmente, el capuchón y la placa con las células son introducidos en el equipo para llevar a cabo el experimento donde los compuestos serán inyectados de manera secuencial siguiendo el flujo de trabajo (Figura 4).

Objetivo 1

El protocolo diseñado para llevar a cabo este experimento se caracteriza por un conjunto de inyecciones de compuestos que, como se describió anteriormente, modulan el metabolismo celular. El equipo toma medidas a lo largo del proceso a tiempo real. Así, toma un primer grupo de medidas de la OCR que representa la respiración basal, ya que no se ha añadido ningún estímulo. A continuación, se inyecta la Oligo, lo que provoca la disminución del consumo de oxígeno y permite determinar la respiración asociada a la producción de ATP. Posteriormente, se inyecta el FCCP que, mediante la inhibición del flujo de H^+ , induce a las células a alcanzar la tasa máxima de respiración. Por último, la inyección de la mezcla de Rot/Ant inhibe totalmente la respiración mitocondrial permitiendo calcular el consumo de O_2 no debido a la función mitocondrial (Figura 6).

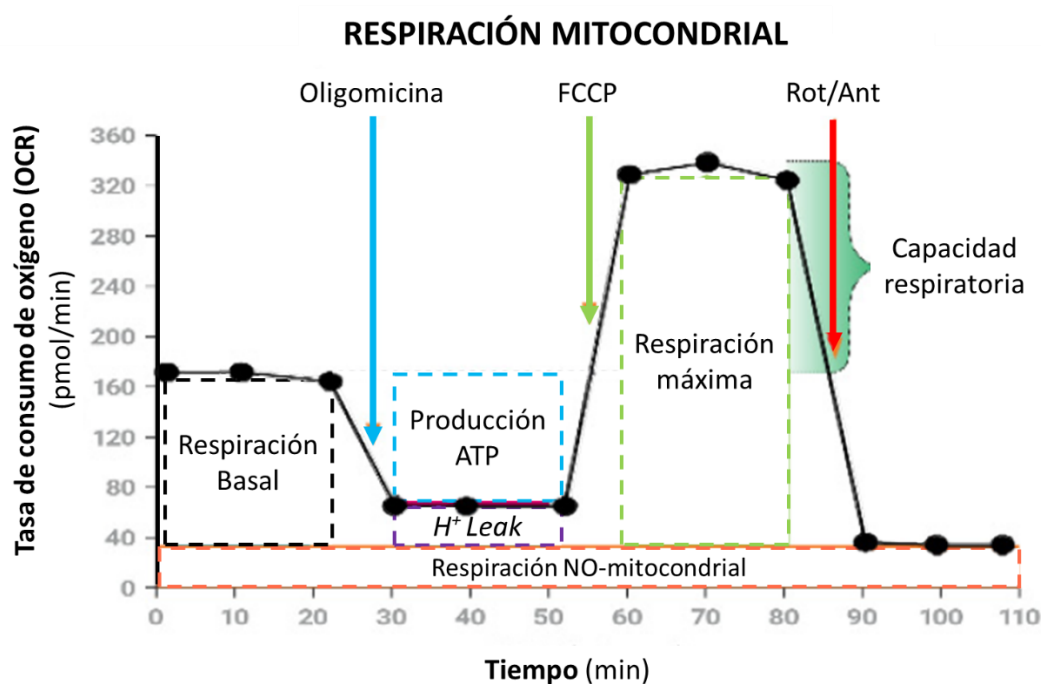


Figura 6 Representación gráfica de los valores obtenidos en la determinación del estrés mitocondrial tras la exposición frente a diferentes estímulos. Medición a tiempo real de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) tras la inyección, de Oligo, FCCP y de Rot/Ant con el fin de calcular los diferentes parámetros.

La medición del OCR se realiza obteniendo entre 15 y 20 valores independientes obtenidos a partir de un promedio de 3 medidas por cada uno (media \pm Desviación Estándar (DE)).

Objetivo 1

A partir de los valores obtenidos (Figura 6), se calculan los siguientes parámetros mediante la aplicación de las ecuaciones recogidas en la Tabla 3:

- **Respiración no-mitocondrial:** se muestra como la tasa de oxígeno consumido por otros procesos celulares no asociados a la mitocondria. Este valor nos permite obtener una medida precisa de la respiración mitocondrial ya que se sustrae a todos los otros valores.
- **Respiración basal:** es la demanda energética de la célula en condiciones basales, ya que muestra el consumo de oxígeno utilizado para satisfacer la demanda de ATP celular resultado de la fuga de H^+ .
- **Respiración máxima:** se muestra como la tasa máxima de respiración que la célula puede alcanzar bajo una situación de “desafío metabólico” donde, a través del efecto de un desacoplador de la cadena respiratoria, se incrementa la demanda energética fisiológica forzando el trabajo de la CTE a su máxima capacidad.
- **H^+ Leak:** se representa como el remanente de la respiración basal que no está asociada a la producción de ATP. Este parámetro puede utilizarse como un mecanismo de regulación de la producción de ATP, sin embargo, también puede ser un indicio de daño mitocondrial.
- **Producción de ATP:** es el ATP producido por las mitocondrias que contribuye a satisfacer las necesidades energéticas de la célula puesto que se obtiene tras la disminución de la tasa de consumo de oxígeno después de inyectar Oligo, representándose mediante la porción de respiración basal que se estaba utilizando para su producción.
- **Capacidad respiratoria:** se muestra como el remanente respiratorio que presenta una célula para ser capaz de responder a una demanda energética por encima de la condición basal. Este parámetro puede ser un indicador de aptitud o flexibilidad celular.

Objetivo 1

Tabla 3 Parámetros y cálculos realizados a partir de los datos adquiridos tras llevar a cabo el protocolo *Cell Mito Stress Test* del *Seahorse XFP*.

<i>Cell Mito Stress Test Kit</i>	
<i>PARÁMETRO</i>	<i>ECUACIÓN</i>
O ₂ no-mitocondrial	tasa de OCR mínima después de inyectar Rot/Ant
Respiración Basal	(última medida de OCR antes de inyectar Oligo) - (consumo de oxígeno NO-mitocondrial)
Respiración máxima	(tasa de OCR máxima después de inyectar FCCP) - (consumo de oxígeno NO-mitocondrial)
<i>H⁺ Leak</i>	(tasa de OCR mínima después de inyectar FCCP) - (consumo de oxígeno NO-mitocondrial)
Producción de ATP	(última medida de OCR antes de inyectar Oligo) - (tasa de OCR mínima después de inyectar Oligo)
Capacidad respiratoria	(respiración máxima) - (respiración basal)

OCR: Tasa de consumo de oxígeno. Rot/Ant: rotenona/antimicina. Oligo: oligomicina

El estudio de cada línea celular se realizó por triplicado y cada experimento tres veces. El análisis de todos los datos obtenidos se realizó utilizando el *software* Wave.

4.- Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este primer apartado de tesis se han analizado desde un punto de vista descriptivo con el objetivo de determinar la depleción del ADNmt en las líneas testadas y comparar su comportamiento frente a las líneas referentes no *Rho-0*.

Objetivo 1

1.- Generación de células *Rho-0* y determinación del número de copias de ADNmt

El estudio de la capacidad de las líneas celulares (3a6 y T/C-28a2) para convertirse en células *Rho-0* se realizó mediante la incubación con las drogas descritas anteriormente, tras la cual se analizó el número de copias de ADNmt que presentaban frente a las células sin tratar.

En primer lugar, se analizó si las células eran capaces de deplecionar su ADNmt siguiendo la metodología clásica, basada en la incubación de las células en presencia de BrEt a bajas concentraciones durante un largo periodo de tiempo. Los resultados mostraron que los niveles de ADNmt en la línea 3a6, tras la incubación con BrEt a una concentración de 100 nM, disminuyen hasta valores del 8,17% (Figura 7 a). Como se muestra en la figura 7 b, después de teñir la red mitocondrial de estas células con MitoTracker® Red durante 30 min, se observó un patrón de distribución de la red mitocondrial difuso alrededor del núcleo característico de las células carentes de ADNmt. Por su parte, la línea celular T/C-28a2 redujo su contenido en ADNmt hasta un 0,69% tras la incubación con BrEt a 0,5 μ M (Figura 7 c). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la capacidad de ambas líneas celulares para disminuir los niveles de ADNmt hasta valores esperados en una línea celular *Rho-0*.

Objetivo 1

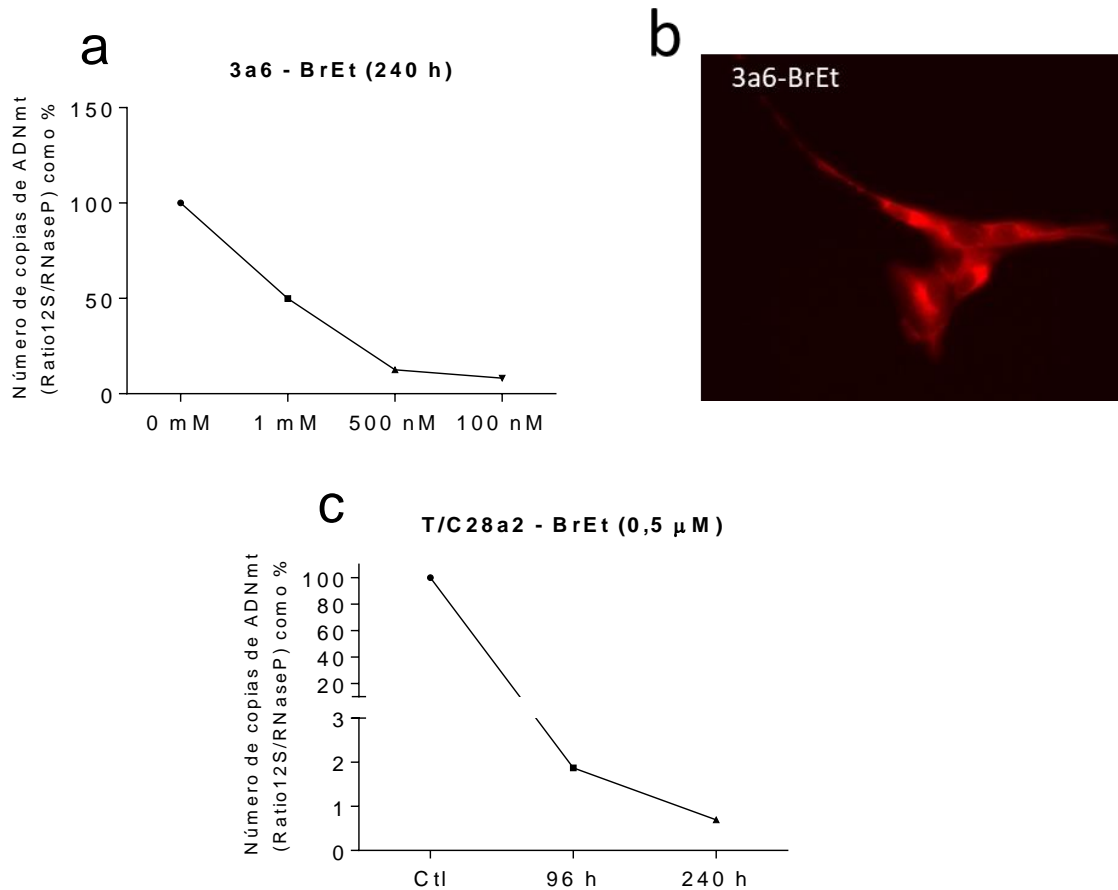


Figura 7 Número de copias de ADNmt en las líneas 3a6 y T/C-28a2 tras haber sido incubadas en presencia de BrEt. **(a)** Línea 3a6 tratada con diferentes concentraciones de BrEt (1 mM, 500 nM y 100 nM) durante 240 h. **(b)** Línea 3a6 teñida con MitoTracker® Red tras la incubación con BrEt durante 240 h. **(c)** Línea T/C-28a2 tratada con 0,5 μM de BrEt (96 y 240 h).

Con el objetivo de estudiar el uso de nuevos compuestos con menor toxicidad que el BrEt para la obtención de células *Rho-0*, se testaron las drogas Rd6g, MPP⁺, AZT y d4t que, por las vías descritas anteriormente, logran la depleción del ADNmt.

La incubación de las 3a6 en presencia de tres concentraciones distintas de Rd6g (1, 3 y 5 μg/ml) durante un tiempo máximo de cultivo de 168 h no tuvo un efecto significativo en los niveles de ADNmt. Tras la incubación a una concentración de 3 μg/ml de Rd6g durante 120 h, las células alcanzaron los niveles más bajos de número de copias de ADNmt (68,5%) en comparación con las células control (100%). Sin embargo, las células incubadas con la concentración más alta (5 μg/L) mostraron un incremento en el contenido de ADNmt comparado con el control (Figura 8 a).

Objetivo 1

Teniendo en cuenta que, en el caso de las 3a6, la concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ de Rd6g fue la que mostró un mayor efecto en la depleción del contenido de ADNmt, las células de la línea T/C-28a2 se incubaron a esta concentración durante 168 h. Los resultados obtenidos mostraron un descenso del número de copias de ADNmt hasta alcanzar un 18% de su contenido (Figura 8 b). Estos datos permiten determinar que las células T/C-28a2 son más sensibles a la incubación con Rd6g que las 3a6.

La incubación de las 3a6 con la menor concentración de MMP⁺ (25 μM) durante 72 h, redujo el porcentaje del número de copias de ADNmt hasta un 41.1% comparado con el control. Este parámetro se vio reducido del mismo modo cuando las células se incubaron durante el mismo tiempo a las concentraciones de 0,5 y 1 mM (Figura 8 c). Este compuesto a altas concentraciones induce muerte celular además de presentar alta toxicidad (33). Debido a este inconveniente, el estudio del efecto del MMP⁺ no se realizó en la línea T/C-28a2.

La evaluación de la capacidad de deplecionar el ADNmt de los compuestos AZT y d4t reveló que cuando las 3a6 se incubaron en presencia de AZT, el número de copias de ADNmt se incrementó en ambas concentraciones testadas (20 μM y 0,5 mM) y en todos los tiempos evaluados (96, 144 y 216 h) (Figura 8 d). Sin embargo, cuando estas células se expusieron a altas concentraciones de d4t (100 μM y 0,5 mM), el contenido de ADNmt celular se vio reducido hasta el 10,84% comparado con el control tras 144 h (Figura 8 e).

En base a estos datos, se evaluó la eficacia del d4t a la concentración de 0,5 mM durante diferentes h en las T/C-28a2 mostrando una bajada hasta el 3,39% del número de copias de ADNmt en comparación con las células sin tratar (Figura 8 f).

Objetivo 1

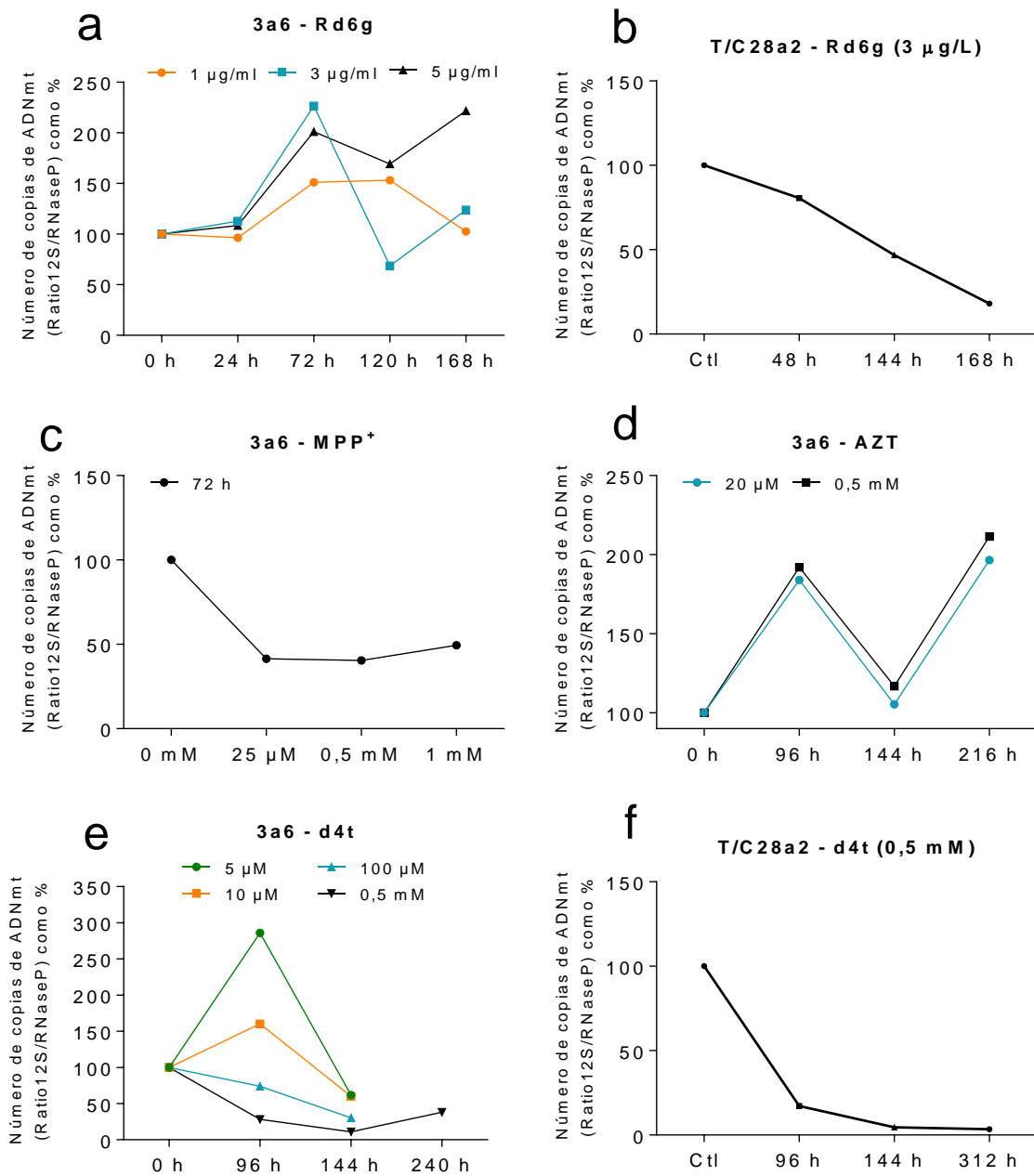


Figura 8 Número de copias de ADNmt en las líneas 3a6 y T/C-28a2 tras haber sido incubadas con diferentes sustancias que deplecionan el genoma mitocondrial. **(a)** Línea 3a6 tratada con Rd6g (1, 3 y 5 µg/ml) durante 24, 72, 120 y 168 h. **(b)** Línea T/C-28a2 incubada durante 48, 144 y 168 h con 3 µg/ml de Rd6g. **(c-e)** Línea 3a6 tratada con MPP⁺ (25 µM, 0,5 mM y 1 mM) durante 72 h, con AZT a 20 µM y 0,5 mM durante 96, 144 y 216 h y con d4t durante 96, 144 y 240 h a diferentes concentraciones (5 µM, 10 µM, 100 µM y 0,5 mM), respectivamente. **(f)** Línea T/C-28a2 tratada con d4t durante 96, 144 y 312 h

Los datos obtenidos ponen de manifiesto que ambas líneas celulares mostraron una mayor disminución en el número de copias del ADNmt en presencia del d4t

Objetivo 1

y, solamente las T/C-28a2 en presencia de la Rd6g. Por ello, los siguientes experimentos se realizaron incubando las células en estas condiciones de cultivo con el objetivo de generar células *Rho-0* y estudiar su comportamiento en ausencia de contenido mitocondrial.

2.- Estudio de las células *Rho-0* generadas

2.1 Estado morfológico de la red mitocondrial en células *Rho-0*: tinción con MitoTracker® Red

Con el fin de estudiar la distribución de la red mitocondrial tras la depleción del ADNmt se llevó a cabo la tinción con MitoTracker® Red de las 3a6 tratadas con d4t y de las T/C-28a2 tras la incubación con Rd6g (Figura 9).

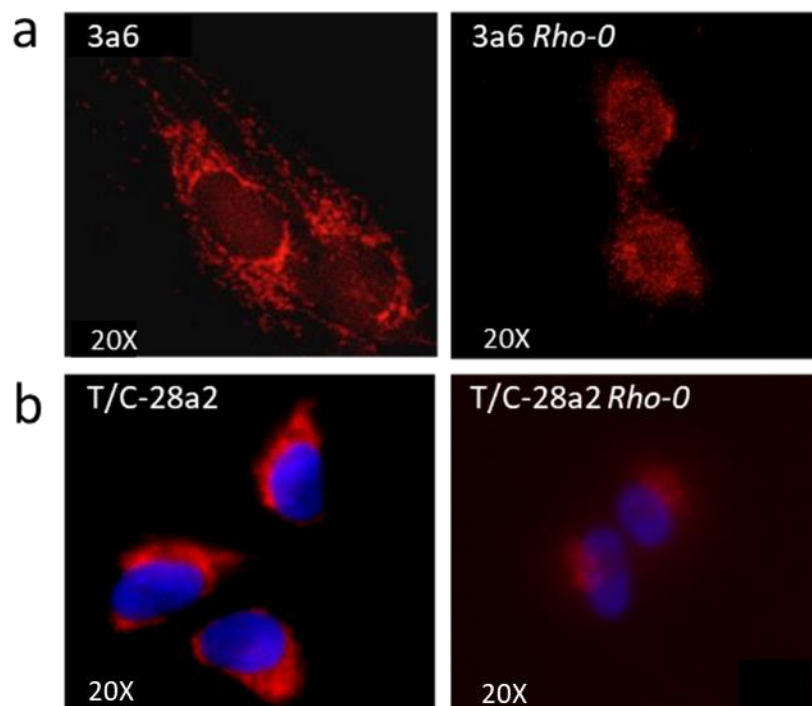


Figura 9 Imágenes de microscopía confocal de la red mitocondrial teñida con MitoTracker® Red. **(a)** Distribución de la red mitocondrial en la línea 3a6 y 3a6 tras haber sido tratada con 0,5 mM de d4t durante 144h (3a6 *Rho-0*). **(b)** Distribución de la red mitocondrial en la línea T/C-28a2 y T/C-28a2 tras haber sido tratada con 3 µg/ml de Rd6g durante 144h (T/C-28a2 *Rho-0*). Todas las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Nikon AR-1 a una magnificación de 200.

Objetivo 1

El análisis comparativo de las imágenes de microscopia tras la incubación de las células en presencia de MitoTracker® *Red* a 250 nM durante 30 min, permitió observar que en la condición control de ambas líneas celulares mostraban una distribución de la red mitocondrial definida a lo largo de todo el citoplasma. Sin embargo, tras la incubación de las 3a6 y T/C-28a2 con d4t y Rd6g, respectivamente, el estudio de la morfología de la red mitocondrial reflejó que esta había experimentado un cambio, presentando una distribución rota o fragmentada, con una localización difusa perinuclear (Figura 9 a-b).

2.2 Determinación de la función mitocondrial: Respiración mitocondrial

La respiración mitocondrial se evaluó usando el kit *Cell Mito Stress Test* (Seahorse Bioscience) lo que permite, tras el estudio del OCR, determinar el funcionamiento de la CTE. Para confirmar si las 3a6 y T/C-28a2 *Rho-0* generadas presentaban un comportamiento similar a otra línea *Rho-0* usada en la literatura, se realizó el análisis de la función mitocondrial en las 143B.TK como línea estándar.

El análisis de los datos obtenidos al evaluar los valores del OCR mostró que, tanto la línea *Rho-0* estándar como las dos líneas generadas en este trabajo de tesis, reflejaron unos valores de OCR basal bajos y que ninguna de las tres respondió a la administración de la Oligo, FCCP o Rot/Ant. Las líneas celulares sin deplecionar el ADNmt mostraron un comportamiento similar respondiendo a los tres estímulos utilizados (Figura 10 a-c).

Estos datos reflejaron que las tres líneas *Rho-0* tienen inhibida la respiración mitocondrial debido a la ausencia del ADNmt y, por tanto, de las 13 proteínas esenciales que se transcriben de este genoma para el correcto funcionamiento de la CTE.

Objetivo 1

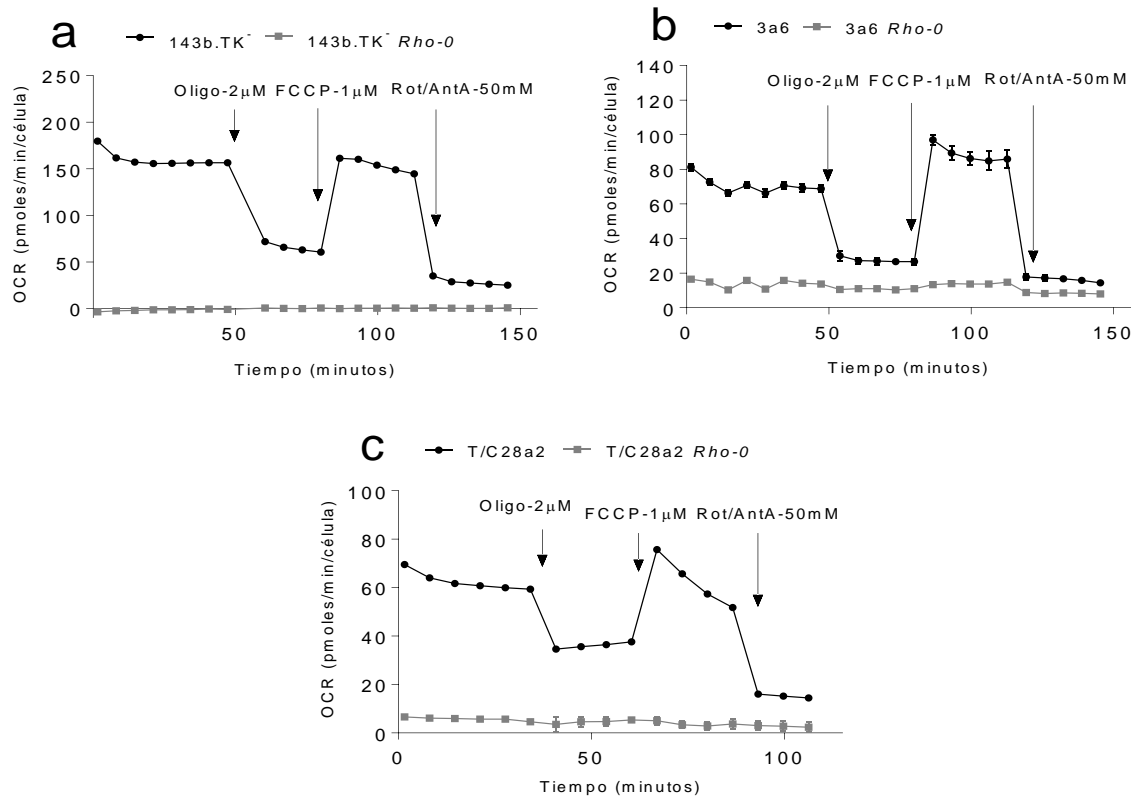


Figura 10 Respiración mitocondrial calculada mediante la tasa de consumo de oxígeno (OCR) utilizando un *Seahorse XFp*. **(a)** Líneas 143B.TK⁻ y 143B.TK⁻ *Rho-0*. **(b)** Líneas 3a6 y 3a6 *Rho-0*. **(c)** Líneas T/C-28a2 y T/C-28a2 *Rho-0*. Oligo: oligomicina. Rot/Ant: rotenona y antimicina.

Objetivo 1

La primera vez que se logró con éxito la obtención de células *Rho-0* a partir de la línea celular 143B.TK⁻ fue usando altas dosis de BrEt durante un periodo largo de tiempo. Las células *Rho-0* así obtenidas se han empleado para la generación de cíbridos transmitocondriales fusionándose en presencia de polietilenglicol (PEG) (12, 24). Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la capacidad del BrEt para deplecionar el ADNmt tanto en una línea de células madre estromales humanas (3a6) como en condrocitos (T/C-28a2), además, de la capacidad de estas células de sobrevivir con un bajo número de copias de ADNmt en presencia de uridina. Debido a que el BrEt es un agente intercalante altamente tóxico que causa efectos negativos en el genoma nuclear, en este trabajo se ha testado la capacidad de diferentes compuestos de reducir el número de copias de ADNmt con una menor toxicidad.

El primer compuesto testado fue la Rd6g cuya principal característica es la inhibición de la fosforilación oxidativa mediante la unión a la membrana interna de la mitocondria reduciendo el número de mitocondrias metabólicamente activas (32, 38). Este compuesto se ha utilizado anteriormente para reducir el ADNmt de diferentes células con el objetivo de generar cíbridos o híbridos utilizando fibroblastos de hámster (39), ratones (40) y humanos (41). Los resultados obtenidos mostraron que la Rd6g presenta una baja capacidad para reducir el contenido de ADNmt en las 3a6, siendo posible que este compuesto cause daño de manera rápida e irreversible en la mitocondria sin llegar a eliminar o a afectar al contenido de ADNmt como se ha descrito anteriormente (41, 42). Sin embargo, la capacidad de reducir el número de copias de ADNmt por este compuesto se puso de manifiesto cuando se usó en la línea celular T/C-28a2 donde la Rd6g generó una disminución del contenido del genoma mitocondrial.

Objetivo 1

Quizás esta respuesta positiva se debe a que la Rd6g no provoca una disfunción mitocondrial tan elevada en la línea celular de condrocitos.

En segundo lugar, se testó el compuesto MPP⁺, el cual inhibe la replicación del ADNmt obstaculizando la incorporación de 5-bromo-20-deoxyuridina a la membrana mitocondrial por lo que no afecta al genoma nuclear (33, 43). Los resultados obtenidos por diferentes estudios sugieren que este compuesto no afecta en profundidad a la biogénesis mitocondrial ya que los niveles de *mitochondrial transcription factor A (TFAM)* no se vieron reducidos, sin embargo, inhibe selectivamente la replicación del ADNmt reduciendo el contenido del genoma mitocondrial (33, 43-45). Del mismo modo se ha descrito que el MPP⁺ inicia la peroxidación lipídica, estimula la producción de *reactive oxygen species (ROS)* y reduce los niveles de ATP, procesos que están implicados en la muerte celular (33). Por todo ello, si bien se ha descrito el MPP⁺ disminuye el número de copias de ADNmt en las 3a6, también incrementa la muerte celular, por lo que las 3a6 consiguieron sobrevivir poco tiempo en presencia de este compuesto.

Los dos últimos compuestos testados, AZT y d4t, forman parte de un grupo de drogas utilizadas en tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana asociado a lipodistrofia. Diferentes autores han sugerido que el efecto tóxico que presentan estos compuestos inhibe la polimerasa de ADNmt γ (34, 46). AZT inhibe la fosforilación de la timidina y podría reducir los niveles de la TTP generando un desequilibrio entre este y otros deoxynucleótidos (36, 37, 47, 48). Los datos obtenidos en este trabajo siguen la misma línea descrita por otros autores, donde la presencia del AZT en el medio de cultivo aumenta el número de copias de ADNmt (36, 49). Actualmente no se conoce en profundidad el mecanismo por el cual este compuesto incrementa el contenido de ADNmt, sin embargo, algunos autores proponen que podría ser mediante la regulación de genes implicados en la codificación de este genoma (50). Otros autores han sugerido que este proceso

Objetivo 1

puede ser un mecanismo compensatorio en respuesta a la disfunción mitocondrial en la cual está incluida la inhibición de la polimerasa- γ (49), el estrés oxidativo (51) y un incremento de la masa mitocondrial mediado por el estrés oxidativo (52, 53).

El otro análogo de la timidina testado fue el d4t, que se describió como un compuesto con mayor toxicidad para la polimerasa- γ (35, 46). Los resultados obtenidos en este trabajo siguen la línea de lo descrito por diferentes autores donde este compuesto muestra la capacidad de inducir una reducción de manera significativa en el contenido de ADNmt (36, 54). El número de copias de ADNmt en ambas líneas en presencia de d4t se vio reducido hasta niveles similares a los de una línea celular *Rho-0*. Además, en ambos casos el bajo contenido mitocondrial se mantuvo durante un periodo de tiempo de cultivo aproximado de 288 h tras haber eliminado el d4t del medio (55). Estos resultados demuestran la estabilidad del bajo número de copias de ADNmt en ausencia de la droga.

El estado de la red mitocondrial en las células *Rho-0* generadas reflejó que su estructura está rota al compararlo con las células control, dato que concuerda con el descrito por diferentes autores al comparar células *Rho-0* obtenidas mediante diferentes metodologías con sus controles (11, 56). Se ha descrito que la depleción del ADNmt en las células está íntimamente relacionada con la pérdida de la morfología de la red mitocondrial, escenario que vemos reflejado en las dos líneas celulares estudiadas (26, 57).

Los datos obtenidos del estudio de la función mitocondrial reflejaron que las células 3a6 *Rho-0* y T/C-28a2 *Rho-0* tienen niveles de respiración mínimos, así como una respuesta nula a los inhibidores de la CTE al igual que las células 143B.TK *Rho-0* (56, 58). Este dato apoya nuevamente que las 3a6 y las T/C-28a2 cultivadas en presencia de d4t y Rd6g, respectivamente, presentaron un comportamiento característico de una línea *Rho-0*.

Objetivo 1

Todos los datos descritos en este apartado de la tesis doctoral indicaron que las células 3a6 y T/C-28a2 tienen la capacidad de reducir su contenido mitocondrial y volverse células *Rho-0*. Este estudio dio paso a la primera publicación que describió un protocolo de generación de células *Rho-0* a partir de una línea de células madre estromales y de condrocitos usando compuestos diferentes al BrEt en la revista *PLoS One* (55) (Anexo III). La generación de células *Rho-0* es el primer paso para la obtención de híbridos transmitocondriales y el estudio del papel de la mitocondria en diferentes procesos celulares.

OBJETIVO 2

Generación y caracterización de un modelo *in vitro* de
cíbridos transmitocondriales.

Objetivo 2

Los cíbridos transmitocondriales son un modelo celular originado a partir de la fusión de una línea celular *Rho-0* (carente de ADNmt) y una célula carente de genoma nuclear, bien, porque se eliminó el genoma de manera previa, o bien, porque carece de núcleo y contiene únicamente genoma mitocondrial (24, 59).

La generación de los cíbridos transmitocondriales es un procedimiento largo donde, tras la fusión de los dos tipos celulares en presencia de PEG, sustancia que favorece la unificación de las membranas celulares, se necesita llevar a cabo una técnica de aislamiento clonal (59). El aislamiento de los clones se realiza mediante dilución límite, esto permite generar diferentes clones de una misma fusión con el objetivo de disminuir la variabilidad interclonal. La variabilidad interclonal es un fenómeno común a la hora de analizar los resultados obtenidos con cíbridos transmitocondriales. Este fenómeno se debe a que no todos los clones obtenidos a partir de una misma fusión tienen porqué comportarse de la misma manera, pudiendo interferir en la interpretación de los resultados (12, 60, 61).

Este proceso conlleva la generación de un modelo celular cuya principal característica es que todas las fusiones presentan el mismo fondo nuclear pero diferente ADNmt, lo que permite el estudio de numerosos parámetros moleculares donde las diferencias observadas se deberán únicamente a las variaciones existentes en el ADNmt de las células (10). Además, debido a que los procesos mitocondriales están controlados por los dos genomas celulares (mitocondrial y nuclear), los cíbridos representan una herramienta útil para tratar de identificar cuál de ellos es el responsable de los defectos observados en las células (9).

Objetivo 2

Los cíbridos transmitocondriales son un modelo celular *in vitro* ampliamente utilizado en estudios donde el ADNmt parece jugar un papel relevante en enfermedades como: síndrome de epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (62), Parkinson (63), Alzheimer (64), síndrome de neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (65), neuropatía óptica hereditaria de Leber (*Leber's hereditary optic neuropathy- LHON*) (66), cáncer y procesos tumorigénicos (67), degeneración macular relacionada con la edad (68, 69) o cardiomiopatía hipertrófica (70). Sin embargo, a pesar de que en los últimos años se ha dado a conocer el efecto que la función mitocondrial y su genoma provocan en el desarrollo de la patología artrósica, avanzando, tanto en el estudio como en el conocimiento de los procesos a nivel molecular que conllevan la degradación y alteración de la estructura articular, no se ha empleado este modelo celular para corroborar a nivel molecular estos resultados.

Actualmente, el estudio de la OA no puede centrarse únicamente en el cartílago, sino que debe llevarse a cabo teniendo en cuenta todos los procesos y estructuras que conforman la articulación. Hoy en día, la articulación es considerada como un órgano, donde todos los tejidos que lo forman: el cartílago hialino, hueso subcondral, membrana sinovial, ligamentos y tendones, interactúan de una u otra manera para el correcto funcionamiento del mismo (1, 5, 8, 71). Teniendo en cuenta que la OA es una enfermedad multifactorial, diferentes factores, no modificables (sexo, edad) y modificables (peso corporal, la dieta o el ejercicio), que interactúan alterando la homeostasis existente entre los tejidos que forman la articulación, se han relacionado con el desarrollo de la enfermedad (72-74). Por un lado, procesos moleculares como el estrés oxidativo asociado al envejecimiento o el efecto de componentes inflamatorios, podrían originar un desequilibrio entre procesos de destrucción y reparación del cartílago dando lugar a los primeros cambios moleculares previos al desarrollo de la OA (75-77). Del mismo modo, datos obtenidos a partir de diferentes estudios epidemiológicos mostraron cómo las

Objetivo 2

interacciones genéticas y epigenéticas contribuyen en la complejidad factorial de la OA. Estos datos reflejan la asociación existente entre diferentes genes nucleares relacionados con el riesgo de desarrollar OA mediante estudios *genome-wide association scans* (GWAS) (78, 79).

A nivel molecular, el cartílago articular, que se encuentra englobado dentro de la cápsula articular, es un tejido “especial” donde el único componente celular presente en él, los condrocitos, viven en unas condiciones de baja disponibilidad de oxígeno y nutrientes. Además, debido a que este tejido carece de vasos sanguíneos y linfáticos, estos se nutren mediante difusión de la glucosa y oxígeno, entre otras sustancias, desde el líquido sinovial a través de la matriz extracelular (MEC) característica de este tejido (80-82). Los condrocitos son los responsables del mantenimiento de la MEC, cuya integridad depende del equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos (creación y destrucción de la MEC, respectivamente) siendo numerosas las alteraciones por las que este puede verse afectado (83).

A pesar de que debido a estas características se ha considerado que los condrocitos son células altamente glucolíticas (84), diversos estudios han resaltado el papel que juega la función mitocondrial en la OA. Así, hoy en día, un mal funcionamiento de la mitocondria se considera como un factor más que podría estar implicado en el origen de esta enfermedad, ROS ya que este tipo celular obtiene al menos un 25% de la energía que necesita a través del ATP sintetizado en la mitocondria (76, 80, 85, 86). Son numerosos los estudios donde se han analizado diferentes parámetros que ponen de manifiesto la alteración mitocondrial tanto en condrocitos, como en sinoviocitos de pacientes OA, al compararlos con los de pacientes sanos (84, 87-90). Así, se sabe que estos componentes celulares, en donantes patológicos, presentan mayor apoptosis, senescencia y mayor producción de ROS y una menor autofagia y actividad de los complejos II y III de la CTE disminuida con su correspondiente deficiencia del $\Delta\Psi_m$ (91).

Objetivo 2

Otro factor relacionado con la susceptibilidad a desarrollar OA descrito anteriormente es el componente genético. Dentro de este, se engloban las variantes genéticas del ADNmt (79). Los haplogrupos de ADNmt son un conjunto de mutaciones establecidas en el genoma mitocondrial a lo largo de la evolución humana. Si bien las mutaciones que caracterizan a los haplogrupos de ADNmt no pueden ser consideradas patológicas, sí pueden afectar al metabolismo mitocondrial (92, 93), por ello, en los últimos años, se ha incrementado el interés por estudiar la relación entre estas mutaciones y diferentes patologías entre las que se encuentra la OA (94-97). Hoy en día, diversos estudios ponen de manifiesto la asociación de los haplogrupos de ADNmt con la incidencia, prevalencia y progresión de la OA. Rego-Perez y colaboradores describieron en una cohorte española (gallega) un menor riesgo de desarrollar OA de rodilla en pacientes portadores del haplogrupo de ADNmt J, así como una progresión menos severa en estos pacientes (98). Estos datos fueron posteriormente validados en pacientes con OA de cadera, estableciendo que esta asociación es característica de la patología al no detectarse en otras enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide y no es específica de la articulación (99). Estos datos se testaron con el objetivo de observar si se reproducían en otras cohortes y, posteriormente, se describió una menor incidencia del haplogrupo de ADNmt T en una cohorte del Reino Unido (100). Del mismo modo, Fernandez-Moreno y colaboradores observaron la misma asociación al agrupar las muestras de pacientes portadores tanto del haplogrupo de ADNmt T como del haplogrupo de ADNmt J, ya que presentan un origen filogenético común (*cluster TJ*), tras un estudio de meta-análisis llevado a cabo tanto en una cohorte americana (*osteoarthritis initiative- OAI*) como en una holandesa (*Cohort Hip and Cohort Knee- CHECK*) (101).

El empleo de la línea celular de híbridos transmitocondriales para el estudio, tanto del efecto funcional de los diferentes haplogrupos de ADNmt, como su relación con enfermedades donde la mitocondria parece jugar un papel importante, no es

Objetivo 2

una línea de investigación reciente en la literatura (60, 93, 102, 103). Sin embargo, a la hora de evaluar la relación existente entre los haplogrupos de ADNmt y la OA, solo se han llevado a cabo estudios poblacionales y meta-análisis. Con el objetivo de buscar una explicación funcional a la asociación entre los haplogrupos de ADNmt y la OA, y teniendo en cuenta que uno de los factores implicados en el desarrollo de la patología artrósica es la disfunción mitocondrial (88), resulta interesante utilizar un modelo celular *in vitro* como son los cíbridos transmitocondriales para profundizar en las diferencias a nivel mitocondrial. Además, también resulta interesante estudiar el efecto que diferentes mutaciones mitocondriales pueden tener en el funcionamiento celular y poder relacionarlo así con el progreso de la enfermedad.

Por todo ello, se llevó a cabo el segundo objetivo de esta tesis, donde se generó un modelo de cíbridos transmitocondriales a partir de la línea celular 143B.TK-*Rho-0*. Como donador del material genético mitocondrial se utilizaron plaquetas de donantes normales (N) y artrósicos (OA) portadores del haplogrupo de ADNmt H o J para, posteriormente, realizar una caracterización molecular y funcional del modelo celular *in vitro* generado.

Objetivo 2

1.- Generación de cíbridos transmitocondriales

1.1 Obtención de células *Rho-0*

La línea celular *Rho-0* utilizada para la generación de los cíbridos fue la 143B.TK *Rho-0* cedida por el grupo del Dr. Rafael Garesse (IIB-CSIC-UAM, España). El ADNmt de esta línea *Rho-0* se deplecionó de manera convencional en presencia de BrEt a bajas concentraciones (50 ng/ml) durante un periodo de cultivos de entre 6 y 8 semanas (Objetivo 1 en el apartado: 1.3).

1.2 Obtención de plaquetas a partir de sangre total en EDTA de donantes normales (N) y artrósicos (OA)

Las plaquetas se obtuvieron a partir de sangre total en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich) extraída a los pacientes en la consulta de Reumatología del Centro Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). Todos los donantes firmaron un consentimiento informado donde aparecen recogidos los principales aspectos del proyecto y posteriormente las muestras fueron anonimizadas (Anexo I).

La selección de los pacientes en el presente trabajo se realizó en base a la patología artrósica, comprobando su presencia o ausencia mediante radiografía. Así mismo, se tuvo en cuenta que los pacientes seleccionados fuesen portadores del haplogrupo de ADNmt H o J en la misma proporción. Una vez reclutados los donantes, se seleccionaron 2 pacientes normales y 2 artrósicos, cuya distribución de sexos y edades aparece reflejada en la Tabla 4.

Objetivo 2

Tabla 4 Descripción de los pacientes seleccionados como donantes de plaquetas para la generación de cíbridos transmitocondriales.

<i>DIAGNÓSTICO</i>	<i>HAPLOGRUPO</i>	<i>SEXO</i>	<i>EDAD</i>
<i>N</i>	H*	Hembra	35
<i>N</i>	J1	Varón	75
<i>OA</i>	H3	Hembra	66
<i>OA</i>	J2	Hembra	66

N: normal. *OA*: artrósico. *H**: subhaplogrupo H que no se corresponde con H1, H3 y H5.

La extracción plaquetaria se realizó mediante centrifugación diferencial a partir de sangre total. En primer lugar, se añadieron 0,1 volúmenes de solución de citrato sódico (0,1 M de citrato sódico y 0,15 M de cloruro sódico) al volumen total de sangre. Tras centrifugar 20 min a 440 rpm a TA, se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 3300 rpm durante 20 min a TA para obtener las plaquetas. A continuación, el precipitado plaquetario se resuspendió en 2 ml de suero fisiológico (0,15 M de cloruro sódico y 15 mM de Tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato (Tris-HCL) a pH 7,4). Una vez obtenidas las plaquetas, se puede llevar a cabo dos procedimientos diferentes en función del destino de las plaquetas:

1. Si las plaquetas se van a usar directamente para una fusión; una vez resuspendidas en el suero fisiológico, ya se podrían usar tras una nueva centrifugación a 3300 rpm durante 10 min.
2. Si las plaquetas se van a congelar, para usarse más adelante; se añade 0,15 ml de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) y 0,3 ml de SBF por cada 1,05 ml de suspensión plaquetaria. Se distribuyen en criotubos y se congelan a -80°C.

1.3 Generación de cíbridos transmitocondriales

Una vez obtenidas las células *Rho-0* y el precipitado plaquetario de cada donante, se llevó a cabo la fusión entre ambos tipos celulares en presencia de PEG, ya que actúa permitiendo la permeabilización de la membrana celular y facilitando la fusión de unas células con las otras (Figura 11).

Objetivo 2

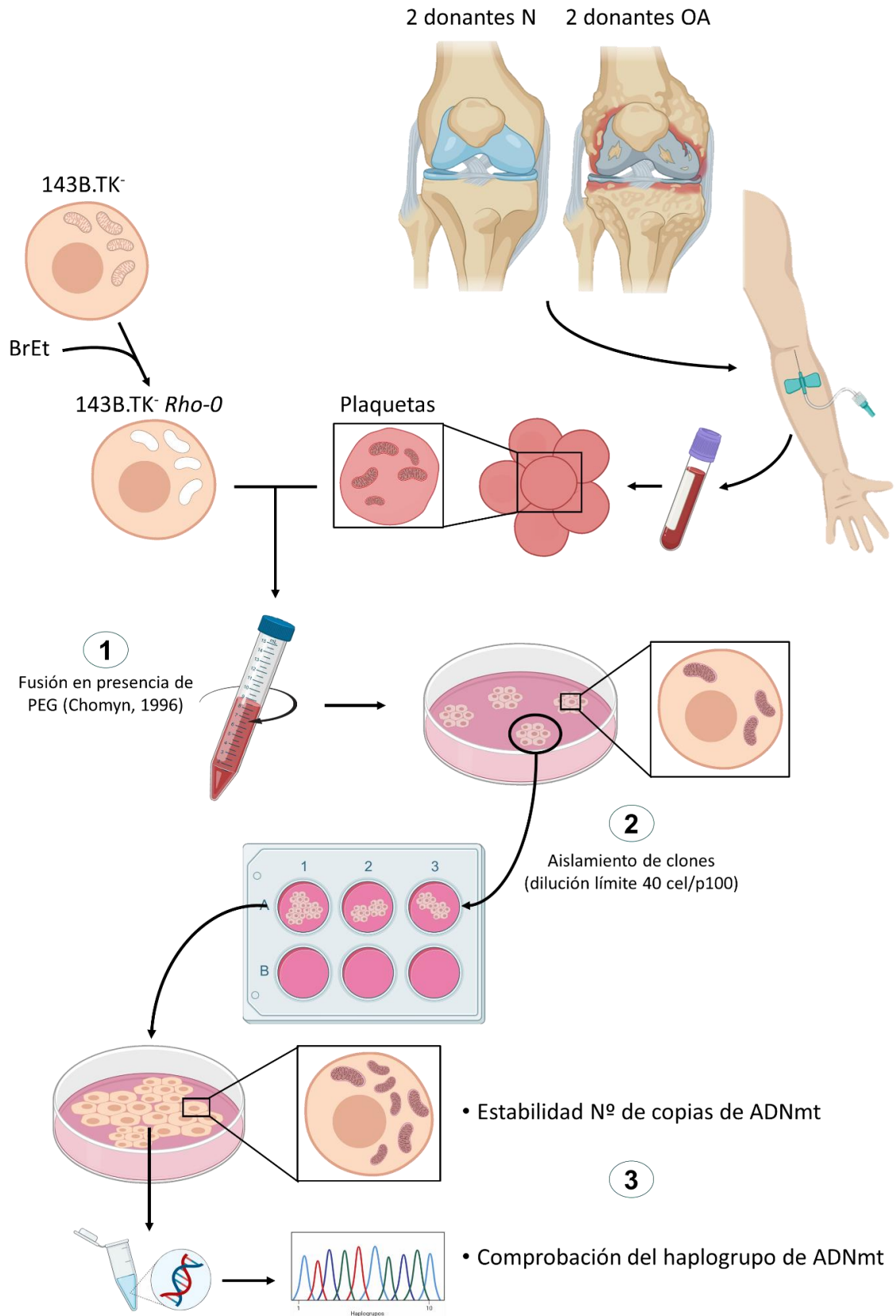


Figura 11 Flujo de trabajo seguido para la generación de cíbridos transmitocondriales. A partir de la fusión de la línea 143B.TK⁻ *Rho-0* (originadas en presencia de BrEt) con las plaquetas de los donantes normales (N) y artrósicos (OA) se obtuvieron los cíbridos. BrEt: bromuro de etidio. PEG: polietilenglicol. ADNmt: ADN mitocondrial. Cel: célula. P100: placa de cultivo petri 100 mm².

Objetivo 2

El resultado es una célula que presenta el mismo fondo nuclear (el de la línea celular 143B.TK-*Rho-0*, en este caso) pero diferente ADNmt (el de las plaquetas de los donantes).

La fusión se llevó a cabo con la metodología descrita por Choming y colaboradores (59), para lo cual, encima del precipitado de plaquetas, se añaden lentamente 2×10^6 células *Rho-0* resuspendidas en medio de cultivo (DMEM al 10% SBF suplementado con uridina) y se centrifugan 1500 rpm durante 10 min. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el conjunto celular con micropipeta en presencia de PEG durante 4 min. Tras 1 min de incubación, y 30 segundos de mezcla nuevamente con pipeta, se eliminó el PEG mediante centrifugación durante 10 min a 1500 rpm. El conjunto celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo con uridina (50 $\mu\text{g/ml}$) para sembrar las células en placa de cultivo de 100 mm² (p100).

Tras 12 h en cultivo, la uridina se eliminó del medio para empezar el proceso de selección y expansión de las células que incorporaron el ADNmt con éxito. Después de un tiempo de cultivo de entre 2-3 semanas, se realizó un aislamiento clonal mediante dilución límite para obtener una población celular originada a partir de una única célula. Para ello, se sembraron únicamente 40 células por p100, lo que permitió el aislamiento individual de cada una de las células. Con el paso del tiempo cada célula se dividió dando lugar a la formación de una colonia. Una vez obtenidas colonias originadas a partir de una sola célula, se aislaron al menos 10 por fusión y se expandieron durante el tiempo necesario para que se reestableciera el total de su número de copias de ADNmt.

2.- Caracterización de híbridos mitocondriales

Para determinar si la fusión tuvo lugar con éxito y si los híbridos obtenidos eran portadores del mismo haplogrupo de ADNmt que el donante de plaquetas, se

Objetivo 2

determinó el haplogrupo de ADNmt de cada uno de los clones. De forma paralela, las células 143B.TK- *Rho-0*, usadas como donante nuclear, se haplogruparon con el fin de conocer su haplogrupo de ADNmt y confirmar que los clones no eran portadores de su ADNmt.

Del mismo modo, con el fin de conocer si tras la fusión, los clones habían sido capaces de reestablecer la maquinaria mitocondrial necesaria para el correcto funcionamiento celular, se evaluó el número de copias de ADNmt.

2.1 Asignación de haplogrupos de ADNmt

La asignación del haplogrupo de ADNmt de los clones obtenidos y de las células *Rho-0* se realizó mediante el análisis de los *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) que definen cada uno de los haplogrupos de ADNmt europeos mayoritarios a través de la técnica de *single base extensión* (SBE) siguiendo la metodología descrita por Rego y colaboradores (98). El SBE se basa en la elongación de una sola base mediante el empleo de didesoxinucleótidos (ddNTP) cuya principal característica es que ponen fin a la elongación del fragmento por parte de la Taq polimerasa y cuya posición se encuentra inmediatamente anterior al SNP que queremos interrogar.

Tras la extracción de ADN total siguiendo la metodología descrita anteriormente (Objetivo 1 en el apartado: 2.1), se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos de ADN que contienen los polimorfismos que definen los haplogrupos mitocondriales europeos mediante PCR múltiple. Para la reacción de amplificación se mezclaron un total de: 75 ng ADN total, 1X tampón de reacción, 1,5 mM cloruro de magnesio, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM cebadores (Tabla 5), 0,025 U/µl de *BioTaq DNA polimerasa* (Bioline) y H₂O hasta completar 10 µl de volumen final, y se llevó a cabo en un termociclador modelo *Verity 96* (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo de amplificación descrito en la Tabla 6.

Objetivo 2

Tabla 5 Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR múltiple y en el SBE para asignar cada una de las posiciones que definen los haplogrupos de ADNmt europeos. Modificado de Rego *et al.*, 2008 (98).

SNP	CEBADOR	CEBADOR SBE
C7028T		
S	5'-CTGACTGGCATTGTATTAGCA-3'	5'-ACACGACACGTACTA
AS	5'-GTATACGGGTTCTTCGAATG-3'	CGTTGTAGC-3'
T4216C		
S	5'-CCTACCACTCACCCCTAGCATTAC-3'	5'-CGCCACTCACCCTA
AS	5'-GCGAGCTTAGCGCTGTGATGAG-3'	GCATTACTTATATGA-3'
A10398G		
S	5'-GGCCTATGAGTGACTACAAAA-3'	5'-ATATATGAGTGACTACAA
AS	5'-TATTCCTAGAAGTGAGATGGT-3'	AAAGGATTAGACTGA-3'
A12308G		
S	5'-CAACCCCGACATCATTACCGGGT-3'	5'-(tacg) ₅ ACCATTGGTCTT
AS	5'-GGGTAAACGAGGGTGGTAAGG-3'	AGGCCCAA-3'
T14766C		
S	5'-GAGAAGGCTTAGAAGAAAACCCAC-3'	5'-CGATCATGAGTGGTTAATT
AS	5'-GTGGGCGATTGATGAAAAGGC-3'	AATTTTATTAGGGGGTTA-3'
G4577A		
S	5'-CCTACCACTCACCCCTAGCATTAC-3'	5'-(at) ₇ TTTTTTACCTGAGTAGGC
AS	5'-TAGGAATGCGGTAGTAGTTAG-3'	CTAGAAATAAACAT-3'
G3010A		
S	5'-CTCGGAGCAGAACCCAA-3'	5'-GATGTTGGATCAGGACATCCC-3'
AS	5'-CTCCGGTCTGAACTCAGA-3'	
C456T		
S	5'-CGTTCAATATTACAGGCGA-3'	5'-ATACCCCCCAACTAACACATT
AS	5'-TTTGGTTGGTTCGGGGTA-3'	ATTTT-3'
T16304C		
S	5'-CTTTCATGGGGAAGCAGA-3'	5'-ATATATATATCAAACCTACCC
AS	5'-CCCTGAAGTAGGAACCAGA-3'	ACCCTAACAG-3'
T6776C		
S	5'-CTGCCATAACCCAATACCA-3'	5'-TTATTATTATTATTATTGTTT
AS	5'-CAGTGAATGAAGCCTCCTA-3'	ATCGTGTGAGCACACCA-3'
G15257A		
S	5'-GAGAAGGCTTAGAAGAAAACCCAC-3'	5'-TATATATATATTCAATGAA
AS	5'-GATCCCGTTTCGTGCAAGAA-3'	TCTGAGGAGGCTACTCAGTA-3'

S: sentido. AS: anti sentido. SBE: Single Base Extension. SNP: mutación de una sola base.

Objetivo 2

Tabla 6 Programas de amplificación utilizados durante el desarrollo de la técnica de asignación de haplogrupos de ADNmt.

PCR múltiple	desnaturalizar 94°C 5 min	35 ciclos	94°C 60 seg 55°C 60 seg 72°C 60 seg	Ext. final 72°C 10 min
ExoSap-IT	activación 37°C 15 min	inactivación 80°C 15 min		
SBE	desnaturalizar 96°C 60 seg	25 ciclos	96°C 10 seg 60°C 5 seg 60°C 30 seg	
Fast-AP	activación 37°C 10 min	inactivación 75°C 5 min		
Reacción de secuenciación	96°C 1 min	25 ciclos	96°C 1 min 60°C 30 seg 60°C 4 min	

SBE: Single Base Extension. Ext: extension.

Una vez comprobado que la amplificación mediante *PCR* tuvo éxito realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en Tampón de Tris-Borato-EDTA (TBE), las muestras se purificaron con *ExoSap-IT* (illustra™ ExoProStar™ 1-Step, Healthcare) añadiendo a 2 µl de muestra y 0,8 µl de esta enzima, cuya función es digerir los fragmentos de cebadores que no se hayan anillado (exonucleasa) y los dNTPs no incorporados (fosfatasa alcalina), siguiendo el programa detallado en la Tabla 6.

A continuación, se realizó el *SBE* con: 1 µl *SNaPshot® Multiplex Kit* (Applied Biosystems) que posee tampón, ddNTPs y la polimerasa necesaria para la elongación, y 0,2 µM cebadores específicos (Tabla 5) siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 6.

Posteriormente, se realizó una segunda purificación mediante fosfatasa alcalina (*Fast-AP*) (Thermo Fisher Scientific) añadiendo a cada muestra 1 µl de esta enzima, 2 µl de su tampón y H₂O completando hasta un volumen final de 20 µl y siguiendo el programa detallado en la Tabla 6.

Objetivo 2

Finalmente, las muestras se cargaron en el secuenciador *ABI 3130XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) configurado con un conjunto de 8 capilares de 36 cm utilizando un polímero que contiene urea: *Performance Optimized Polymer 4* (Applied Biosystems). Previamente, las muestras se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C en 9,35 µl de *Hi-Di™ Formamide* (Applied Biosystems) como vehículo de los fragmentos en el interior de los capilares y 0,15 µl del marcador de peso molecular interno *GeneScan™ 120 LIZ™ dye Size Standard* (Applied Biosystems). Tras la secuenciación, los datos se analizaron con el programa informático *Genemapper v4.0* (Applied Biosystems) asignando cada *SNPs* a cada uno de los fragmentos de interés a partir de una secuencia de referencia.

Aquellas muestras en las que con la combinación de *SNPs* interrogados con la técnica descrita anteriormente (*SBE*) no se definió un haplogrupo de ADNmt, se realizó una nueva amplificación mediante *PCR* convencional utilizando los cebadores descritos en la Tabla 7.

Tabla 7 Secuencia de los cebadores utilizados en la *PCR* convencional y en la secuenciación para asignar haplogrupos de ADNmt.

<i>SNP</i>	<i>CEBADORES</i>
<i>T14465C</i> S	5'-ATGCCTCAGGATACTCCTCAATAGCCATC-3'
AS	5'-CCGTGCGAGAATAATGATGTATGC-3'

S: sentido. *AS*: anti sentido. *SNP*: mutación de una sola base. *SBE*: single base extensión.

Tras la obtención del producto de *PCR* amplificado, las muestras se purificaron con *ExoSap-IT* y se procedió con la secuenciación. La reacción de secuenciación consistió en: 1X tampón de reacción, 0,4 µM cebador AS de la Tabla 7, 0,5 µl de *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* y H₂O hasta completar 11 µl de volumen final siguiendo el programa descrito en la Tabla 6.

Posteriormente, se llevó a cabo la purificación de las secuencias mediante bomba de vacío. Para ello se utilizó el kit *Montage™ SEQ Sequencing Reaction Cleanup*

Objetivo 2

(Merk Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 30 μ l de *Sequencing Wash Solution* a cada muestra y se llevó a la placa de vacío. Una vez lavadas las muestras 2 veces, se añadió 25 μ l de *Injection Solution* y se incubó 10 min en agitación a TA.

Finalmente, todas las muestras se cargaron en el secuenciador *ABI 3130XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Tras la secuenciación, los datos se analizaron con el programa *Sequencing Analysis Software 6* (Applied Biosystems) y se asignaron los haplogrupos de ADNmt restantes.

2.2 Estabilización y determinación del número de copias de ADNmt

Para determinar si el número de copias de ADNmt se estabilizó en los clones tras la fusión, se siguió la metodología descrita anteriormente (Objetivo 1 en el apartado: 2.3), donde se establece un ratio entre el número de copias del gen mitocondrial *ARNr 12S* y el gen nuclear *RNasaP* a partir de los valores obtenidos mediante *RT-PCR*.

Para el estudio de la estabilización del número de copias de ADNmt durante los diferentes pases de cultivo, se recogieron 5×10^5 células para posteriormente extraer el ADN total. De esta manera, este parámetro se analizó a lo largo de diferentes pases de cultivo.

Este parámetro también se utilizó para realizar un análisis comparativo entre el número de copias presentes en los cíbridos N frente a los cíbridos OA, y a su vez, este valor se comparó entre los haplogrupos de ADNmt a estudio. Para este análisis las células se recogieron una vez se estabilizó el número de copias de ADNmt.

Objetivo 2

3.- Cultivo celular

Los híbridos generados en este trabajo de tesis se crecieron de manera estándar en DMEM 4,5 gr/L, 1 mM de piruvato sódico y 4 mM de glutamina, suplementado al 10% con SBF y P/E. Una vez obtenida una confluencia aproximada del 80%, se sembraron en número y superficie adecuada para cada uno de los experimentos.

Teniendo en cuenta que las células utilizan como fuente de energía el carbono presente en el medio de cultivo, cuando el experimento lo requirió, los híbridos se crecieron en medio de cultivo con diferentes concentraciones de glucosa y piruvato sódico, cuya composición aparece detallada en la Tabla 8. Todas estas diferentes condiciones de cultivo nos permitieron estudiar el efecto que tiene la obtención energía a través de diferentes vías metabólicas analizando, para ello, diferentes parámetros moleculares.

Tabla 8 Composición de los medios de cultivo utilizados.

	<i>GLUCOSA</i>	<i>PIRUVATO</i>
<i>DMEM 4,5 +P</i>	25 mM (4,5 gr/L)	1 mM
<i>DMEM 4,5 -P</i>	25 mM (4,5 gr/L)	-
<i>DMEM 1 +P</i>	5,5 mM (1 gr/L)	1 mM
<i>DMEM 1 -P</i>	5,5 mM (1 gr/L)	-

En todos los experimentos desarrollados en condiciones de normoxia, las células se mantuvieron al 5% de CO₂, 37°C, humedad a saturación y el medio se cambió dos veces por semana. Así mismo, cuando resultó interesante estudiar la eficiencia celular bajo diferentes porcentajes de O₂, las células se cultivaron en hipoxia al 5% de O₂ y de CO₂, 37°C y humedad a saturación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado utilizando 2 clones por cada híbrido.

Objetivo 2

Debido a que la expansión celular en diferentes condiciones de cultivo puede afectar tanto al crecimiento como a la morfología celular se evaluaron ambos parámetros.

3.1 Estudio de la morfología celular mediante microscopía óptica

Para evaluar si las células experimentaron un cambio fenotípico en las diferentes condiciones de cultivo descritas, se llevó a cabo un estudio descriptivo de la morfología celular. Para ello, las células se sembraron en placa multipocillo con 24 pocillos (*MW-24*), 1×10^4 células por pocillo. Tras 48 h de cultivo, sin cambiar el medio, se procedió al estudio de la morfología celular utilizando un microscopio óptico invertido (*Nikon Eclipse TS100*), realizando imágenes con el objetivo 20X mediante el empleo de una cámara acoplada al microscopio *XM Family 1080Pg*.

3.2 Crecimiento celular y tiempo de duplicación (TD)

El estudio del crecimiento celular se realizó sembrando 4×10^4 células por pocillo en *MW-6* en cada una de las condiciones nutritivas descritas anteriormente (Tabla 8). Dado que la tensión de O_2 a la cual crecen las células es importante a la hora de realizar estudios posteriores, se analizó este parámetro creciendo las células en condiciones de normoxia e hipoxia durante un tiempo máximo de 96 h.

Tras los tiempos de incubación, y con un intervalo de 24 h entre cada uno, se llevaron a cabo contajes celulares. Para ello, en primer lugar, se lavó con solución salina isotónica (0,9% NaCl) para eliminar las células muertas. Las células se incubaron durante 3 min a 37°C con 300 μl de Tripsina 2X en solución salina (Sigma-Aldrich) y, a continuación, se neutralizó con 700 μl de *DMEM* suplementado con 10% SBF. Por último, se realizó el contaje celular utilizando una cámara de Neubauer. De esta manera se obtuvo el número total de células en cada uno de los puntos del crecimiento. Una vez obtenidos los datos por triplicado se calculó el tiempo de duplicación (TD) para cada uno de ellos aplicando la fórmula:

Objetivo 2

$$TD = \frac{(t-t_0) \text{ Log } 2}{(\text{Log } N - \text{Log } N_0)}$$

Donde t es el tiempo final de cada uno de los contajes (24, 48, 72 y 96 h), t_0 es el tiempo inicial (0 h), N es el número final de células a tiempo t y N_0 es el número inicial de células.

4.- Actividad de la enzima citrato sintasa (CS) y de los complejos de la cadena de transporte electrónico (CTE)

Para llevar a cabo el desarrollo de este apartado, se estableció una colaboración con el grupo del Dr. Miguel Ángel Martín del Hospital 12 de octubre de Madrid.

La espectrofotometría es una técnica que proporciona una medida de absorbancia (abs) de luz por parte de una muestra, siendo posible la extrapolación de esa medida a la concentración de la sustancia de interés en la muestra que se está estudiando (104).

Las medidas de actividad de la enzima citrato sintasa (CS) y actividad de los complejos de la CTE se realizó siguiendo la metodología descrita por Dimauro y colaboradores con modificaciones llevadas a cabo por Medja y colaboradores (105, 106).

A continuación, se detallará brevemente la metodología utilizada para la obtención de los resultados de actividad de la enzima CS, así como de los complejos de la CTE.

4.1 Aislamiento de mitocondrias a partir de cíbridos transmitocondriales

Para realizar el aislamiento de mitocondrias, con el objetivo de purificar las enzimas necesarias para estudiar la actividad enzimática, se obtuvieron entre

Objetivo 2

30-35x10⁶ células de cada uno de los cíbridos. El aislamiento se desarrolló siguiendo el protocolo descrito previamente por Nitjmans y colaboradores (107).

4.2 Actividad de la enzima Citrato Sintasa (CS)

La actividad de la enzima CS mediante espectrofotometría se usará posteriormente tanto como una medida propia e indicativa de la masa mitocondrial, así como para relativizar los demás valores de la actividad de los complejos de la CTE.

De manera simplificada, la actividad de la CS se cuantificó en base a la reacción del ácido 5,5-Ditio-bis-2-nitrobenzoico con el producto CoA-SH formando ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, una sustancia colorimétrica cuya abs máxima es a 412 nm.

El cálculo de la actividad CS se obtuvo mediante la siguiente fórmula: $\Delta(\text{Abs}/\text{min}) = \text{Abs}/\text{min}$ con oxalacetato. A partir de los valores obtenidos, se calculó la actividad enzimática (U/L) que se normalizó frente a la concentración de proteínas de cada uno de los extractos, obteniendo la actividad específica (AE) de la enzima.

4.3 Actividad enzimática de los complejos de la CTE: NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinol-citocromo C oxidoreductasa (complejo III) y citocromo C oxidasa (complejo IV)

Según la metodología establecida por el grupo del Dr. Miguel Ángel Martín a partir del protocolo establecido por Medja y colaboradores (106), la actividad de los complejos se calculó como se describe a continuación:

- **La actividad del complejo I** se cuantificó en base a la oxidación del NADH. El uso de la rotenona permite excluir los valores de oxidación de la NADH debida a otros complejos puesto que inhibe casi por completo la actividad del complejo I.
- **La actividad del complejo II** se midió en base a la oxidación de succinato.

Objetivo 2

- **La actividad del complejo III** se determinó a través de la obtención de citocromo c reducido con y sin antimicina. La antimicina inhibe casi por completo la actividad del complejo III y permite extraer los valores debidos a otros complejos.
- **La actividad del complejo IV** se cuantificó a través de la oxidación de citocromo c.

A partir de los resultados de Abs/min obtenidos, se calculó la AE de cada una de las muestras y se normalizaron frente a la AE de la CS.

5.- Estado de la red mitocondrial en cíbridos

La citometría de flujo permite, mediante la utilización de un láser, clasificar las células en función de su tamaño y complejidad con los parámetros *Forward scatter* (FSC) y *Side scatter* (SSC), lo que proporciona el análisis de una población homogénea. Del mismo modo, mediante el empleo de un láser de luz azul que excita moléculas fluorescentes, la intensidad de fluorescencia generada por el fluoróforo de interés se recoge en distintos canales de fluorescencia (FL-1, FL-2, FL-3 o FL-4), permitiendo su cuantificación.

En el desarrollo del presente trabajo se utilizó el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) analizando 1×10^4 células en cada condición de trabajo por triplicado. Los resultados se analizaron con la herramienta informática *BD CellQuest™ Pro Analysis* y se expresaron como una media \pm DE.

5.1 Determinación de la masa mitocondrial

La morfología de la red mitocondrial de los cíbridos generados se determinó utilizando MitoTracker® *Red* como colorante. La cuantificación de la fluorescencia se realizó con el mismo fluoróforo, analizando, por un lado, la fluorescencia de

Objetivo 2

imágenes obtenidas a través de microscopía confocal y, por otro lado, la intensidad de fluorescencia obtenida a través de citometría de flujo.

En primer lugar, para llevar a cabo la tinción de los híbridos con MitoTracker® *Red* se siguió la metodología descrita anteriormente (Objetivo 1 en el apartado: 3) y la intensidad de fluorescencia de las imágenes se analizaron utilizando el paquete informático *Image J* (108).

En segundo lugar, la cuantificación mediante citometría de flujo se llevó a cabo en base a las características del fluoróforo MitoTracker® *Red*, ya que, una vez marcadas las células, emite a una λ de 644 nm (espectro rojo) que puede ser analizada a través del canal FL-2 del citómetro de flujo. Para ello se sembraron 9×10^4 células por pocillo en *MW-6*. Como estímulo para el desarrollo de esta metodología, se utilizó la presencia o ausencia de piruvato sódico, incubándose durante 48 h en *DMEM* 4,5 gr/L de glucosa. A continuación, las células se marcaron con MitoTracker® *Red* a una concentración final de 250 nM durante 30 min en oscuridad. Posteriormente se lavaron, tripsinizaron, centrifugaron y resuspendieron en 400 μ l de solución salina y finalmente se pasaron por el citómetro de flujo.

5.2 Determinación del potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$)

El estudio del $\Delta\Psi_m$ se efectuó tiñendo las células con un fluoróforo catiónico denominado *1,1',3,3,3'-hexamethylindodicarbo-cyanine idodide* (*DilC1(5)*) (Immunostep). Este fluoróforo penetra en el citosol de las células mediante difusión pasiva y, posteriormente, se acumula en las mitocondrias con el $\Delta\Psi_m$ activo, produciendo fluorescencia directamente proporcional al $\Delta\Psi_m$. A medida que aumenta el número de mitocondrias despolarizadas, la intensidad de fluorescencia disminuirá. La señal emitida por *DilC1(5)* a 658 nm será detectada en el canal FL-4 (rojo lejano) del citómetro de flujo.

Objetivo 2

5.2.1 Puesta a punto de un control positivo para el estudio de la despolarización de la membrana mitocondrial

Antes de analizar el nivel de $\Delta\Psi_m$ en el modelo celular, es necesario establecer un control positivo de la técnica en los cíbridos generados. Para ello se testaron tres compuestos (Oligo, FCCP y estaurosporina) únicamente en cíbridos OA debido a que, desde nuestra premisa de trabajo, serán estos lo que presenten una mayor susceptibilidad a los estímulos. Las funciones de la Oligo y el FCCP, como modificadores de la función mitocondrial, se describieron anteriormente (Objetivo 1 en el apartado 3.2). La Oligo inhibe la función de la ATP sintasa mitocondrial y el FCCP es un protonóforo que actúa como desacoplador entre la CTE y la fosforilación oxidativa, siendo ambos compuestos, capaces de alterar el $\Delta\Psi_m$. La estaurosporina es un producto natural producido por la bacteria *Streptomyces staurosporeus* que fue aislado por primera vez en 1977 (109). Su principal función es inhibir las proteínas quinasas evitando su unión con el ATP. Además, se sabe que la estaurosporina induce apoptosis mediante activación de la caspasa-3 (110) y se ha descrito que, durante el proceso apoptótico, el metabolismo energético mitocondrial se interrumpe afectando al $\Delta\Psi_m$ (111). Debido al papel que presenta este compuesto, se testó su capacidad como control positivo para la alteración del $\Delta\Psi_m$ en los cíbridos.

Para llevar a cabo la puesta a punto, se sembraron 9×10^4 células por pocillo en MW-6. Tras 48 h de crecimiento, las células se incubaron con Oligo durante 60 min a dos concentraciones diferentes (2,5 y 5 $\mu\text{g/ml}$), con FCCP a una concentración de 1 μM durante 90, 120 y 180 min o con estaurosporina a una concentración 2 μM durante 15, 30, 60 y 90 min. En todos los casos, cada uno de los experimentos se acompañó de una condición basal (células no tratadas). Tras el tiempo de incubación, se levantaron las células, se centrifugaron 10 min a 1500 rpm y finalmente se incubaron 15 min con 5 μl de *DilC1(5)* en oscuridad. Posteriormente se pasaron las células por el citómetro de flujo, como se describió anteriormente.

Objetivo 2

6.- Aislamiento de ARN y retrotranscripción a ADNc**6.1 Aislamiento de ARN y cuantificación**

La extracción de ARN total se realizó mediante el uso del reactivo comercial *TRIZOL® Reagent* (Thermo Fisher Scientific) que es un compuesto fenólico que contiene isocianato de guanidina y mantiene la integridad del ARN cuando se lleva a cabo el lisado celular.

Para la obtención de ARN, se añadió 1 ml de *TRIZOL® Reagent* a las células previamente centrifugadas y se incubó 5 min a TA. A continuación, se añadieron 300 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich), logrando una separación en dos fases: fase acuosa (ARN) y fase orgánica (restos celulares), tras una incubación durante 3 min a TA y la posterior centrifugación de las muestras durante 15 min a 12000 rpm a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN tras un periodo de incubación de 10 min en presencia de isopropanol (Sigma-Aldrich) y una centrifugación de 10 min a 12000 rpm 4°C. A continuación, se lavó el precipitado con etanol al 75% frío y se centrifugo durante 5 min a 13000 rpm. Por último, el precipitado celular se resuspendió en H₂O libre de RNAsas.

La cuantificación del ARN se realizó utilizando el Nanodrop ND 1000 siguiendo la metodología descrita anteriormente (Objetivo 1 en el apartado: 2.2), siendo la λ utilizada para la cuantificación del ARN, 230 nm.

6.2 Retrotranscripción de ARN a ADNc

La retrotranscripción del ARN se llevó a cabo con el kit *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYtech) el cual presenta una combinación de oligo dT y *Random Hexamer* favoreciendo una mayor sensibilidad. Para ello se partió de un total de 500 ng de ARN a los cuales se les añadió 10 µl de *NZYRT 2x Master Mix*, 2 µl de *NZYRT Enzyme Mix* y H₂O hasta completar un volumen final de 20 µL. A

Objetivo 2

continuación, se incubó primero a 25°C durante 10 min y seguidamente a 50°C durante 30 min. Posteriormente se añadió 1 µl de *NZY RNase H* y se aplicaron 37°C durante 20 min.

El ADNc obtenido se diluyó a una proporción 1/10 en agua libre de ARNasas y se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

7.- Expresión génica de enzimas implicadas en la biogénesis mitocondrial

El análisis de la expresión génica se realizó mediante *RT-PCR* en un *LightCycler*® 480 II (Roche) utilizando sondas *Taqman*® *UPL Probe* (Roche Diagnostics). Esta técnica está basada en la detección directa a tiempo real de la amplificación del ADNc. La unión de oligonucleótidos (20 pares de bases) específicos en la secuencia de interés emite fluorescencia en cada ciclo de amplificación, logrando el seguimiento a tiempo real. La fluorescencia emitida se denomina *Flourescence Resonance Energy Transfer (FRET)* y es debida a que la sonda presenta un fluoróforo reportero (*reporter*) en uno de sus extremos y una molécula apagadora (*quencher*) en el otro. El *quencher* inhibe directamente el *reporter* ya que se encuentran cerca el uno del otro, sin embargo, cuando la actividad 5' de la exonucleasa de la ADN polimerasa degrada los nucleótidos de la sonda durante el ciclo de amplificación, estos se separan y el reportero comienza a emitir fluorescencia. A medida que el número de amplicones se incrementa, se produce un aumento de la intensidad de fluorescencia emitida. Esto es debido a la hidrólisis de las sondas unidas a los fragmentos de interés, de modo que, cuanto mayor sea el número de fragmentos, mayor será la intensidad de fluorescencia.

La reacción de amplificación se realizó por duplicado y cada muestra por triplicado en placas con 96 pocillos (*MW-96*) (Roche) opacas a partir de 2 µl de ADNc y 8 µl de una mezcla compuesta por: *LightCycler*® *Probes Master 2x*, sonda

Objetivo 2

Taqman® UPL a 10 µM, cebador a 20 µM ambos específicos del fragmento a evaluar y agua hasta completar un volumen final de reacción de 10 µl. La amplificación se llevó a cabo durante un primer ciclo de pre-incubación a 95°C durante 10 min, 45 ciclos que comprende un proceso de desnaturalización a 95°C durante 10 seg, anillamiento a 60°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 1 seg; seguidos del enfriamiento a 40°C durante 30 seg.

El diseño de cebadores, así como la elección de la sonda *Taqman*® UPL correspondiente a cada gen, se realizó utilizando la herramienta informática *Universal ProbeLibrary* (https://lifescience.roche.com/en_es/articles/Universal-ProbeLibrary-System-Assay-Design.html). El diseño se optimizó para una longitud de cebador comprendida entre 18 y 22 nucleótidos y una temperatura de anillamiento de 59-60°C, con un contenido en guanina/citosina (G/C) de 50% y una longitud de amplicón no superior a 120 nucleótidos.

El conjunto de genes analizados, así como los cebadores y las sondas *Taqman*® UPL utilizados, se recogen en la Tabla 9. La expresión génica de cada uno de los genes de interés se normalizó frente al gen de referencia de la proteína ribosómica L13a (*Ribosomal Protein L13a- RPL13A*), a partir de los valores *Ct* utilizando el paquete informático *qbase+* (Biogazelle).

Objetivo 2

Tabla 9 Genes analizados mediante expresión génica. Secuencias de los cebadores y sondas correspondientes.

GEN	PROTEÍNA		CEBADOR (5'-3')	#
RPL13A	Ribosomal Protein L13a	S	CAAGCGGATGAACACCAAC	28
		AS	TGTGGGGCAGCATACCTC	
PGC-1 α	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 α	S	TGAGAGGGCCAAGCAAAG	13
		AS	ATAAATCACACGGCGCTCTT	
NRF1	Nuclear Respiratory Factor 1	S	GGGAAAGAAAGCTGCAAG	49
		AS	GTGCCTGGGTCCATGAAA	
TFAM	Transcription Factor A, Mitochondrial	S	CTATGGCCTGTGGATCAAATC	27
		AS	AAACACAATTCCTAGCTCACAGG	
HIF1A	Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit	S	TGGAATGGAGCAAAAGACAA	3
		AS	TGGTCAGCTGTGGTAATCCA	
NFE2L2	Nuclear Factor Erythroid-Derived 2-Like 2	S	GCAACAGGACATTGAGCAAG	52
		AS	TGGACTTGGAAACCATGGTAGT	
SOD2	Superoxide dismutase 2	S	CTGGACAAACCTCAGCCCTA	22
		AS	TGATGGCTTCCAGCAACTC	
BCL2	B-cell lymphoma 2, Apoptosis regulator	S	GCAGGAGGATAACCTGGATG	41
		AS	TGGGTGACCACTAGCGAAA	
BECN	Beclin 1	S	CAGGCTGAGGCTGAGAGACT	69
		AS	GCTCCAGCTGCTGTCGTT	
SLC2A1	Solute Carrier Family 2 Member 1	S	AGTGTCACCCACAGCCTTTC	81
		AS	AGTCCAGGCCGAACACCT	
SLC2A3	Solute Carrier Family 2 Member 3	S	GGGTGTGGTTAATACTATCTTCACTG	31
		AS	TCATATGCAGAGTCCTTCTTCTCT	
HK2	Hexokinase 2	S	AGAAGCTCCCACTGGGTTTT	87
		AS	CATGAGACCAGGAAACTCTCG	
MPC2	mitochondrial pyruvate carrier 2	S	ATGCTGCCCCGAGAATTG	62
		AS	TGGAGCCCAGAAGAAAACCTG	
CPT1b	Carnitine Palmitoyltransferase 1B	S	GAGCAGCACCCCAATCAC	10
		AS	AACTCCATAGCCATCATCTGCT	
MFN2	Mitofusin 2	S	TCAGCTACACTGGCTCCAAC	83
		AS	CAAAGGTCCCAGACAGTTCC	
FIS1	Fission, Mitochondrial 1	S	CTGAACGAGCTGGTGTCTGT	62
		AS	GAGCCTGCTGCCTTCTCA	

#: número de sonda correspondiente a la Universal ProbeLibrary de Roche. S: sentido. AS: anti sentido.

Objetivo 2

8.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los resultados de este trabajo se representaron como la media \pm DE de 3 experimentos independientes, a excepción de aquellos casos en los que los resultados se analizaron desde un punto de vista descriptivo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete informático *GraphPad Prism* versión 6.01 (GraphPad). Para evaluar las diferencias entre los grupos se realizaron los análisis estadísticos detallados en la Tabla 10:

Tabla 10 Análisis estadísticos utilizados en cada una de las comparaciones.

<i>ANÁLISIS</i>	<i>SÍMBOLO</i>	<i>TEST</i>
<i>N vs OA</i>	*	<i>t test no-pareado (t de Student)</i>
<i>+P vs -P</i>	\$	<i>t test no-pareado (t de Student)</i>
<i>DMEM 4,5 vs 1</i>	a	<i>t test no-pareado (t de Student)</i>
<i>basal vs condición</i>	b	<i>t test pareado (t de Student)</i>
<i>H vs J</i>	#	<i>test no-paramétrico de Mann-Whitney</i>

N: normal. OA: artrósico. +P: con piruvato. -P: sin piruvato.

En el caso de que se utilice otro tipo de análisis estadístico, la metodología utilizada se detallará en cada uno de los apartados correspondientes. Los valores analizados con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Objetivo 2

1.- Caracterización de cíbridos transmitocondriales

1.1 Asignación de haplogrupos de ADNmt

La asignación de haplogrupos de ADNmt se realizó mediante la técnica de SBE, donde se interrogaron diferentes SNPs que definen los haplogrupos de ADNmt más comunes en Europa.

La asignación del haplogrupo de ADNmt se llevó a cabo tanto en el ADN de la sangre total extraída de los donantes (N y OA), como de cada uno de los clones obtenidos a partir de las fusiones realizadas, con el objetivo de comprobar si los cíbridos generados presentaban el mismo haplogrupo de ADNmt que el donante a partir del cual se habían generado.

Para estar seguros de que tras la fusión no quedaba ADNmt de la línea *Rho-0*, las células 143B.TK⁻ también se haplogruparon, y el análisis de la combinación de SNPs mostró que esta línea celular era portadora del haplogrupo de ADNmt X (Figura 12).

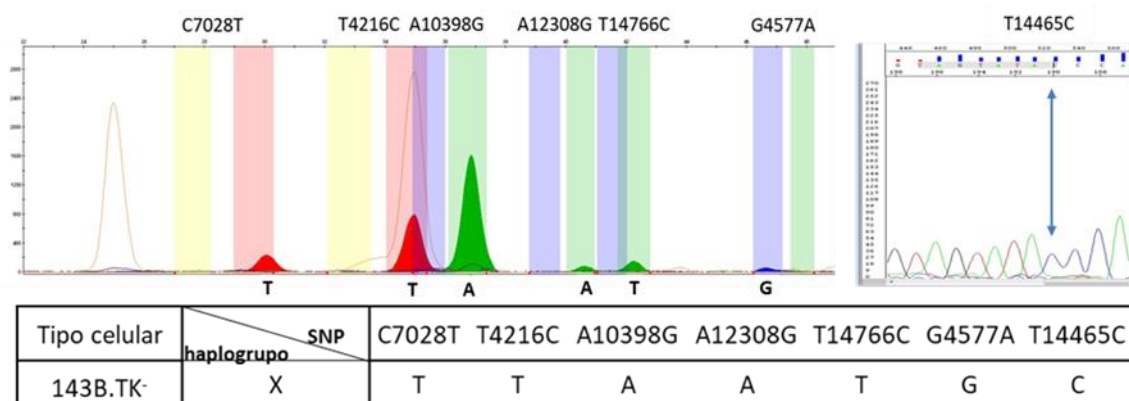


Figura 12 Electroferograma obtenido tras el haplogrupado de la muestra correspondiente a las 143B.TK⁻. En la imagen se observa el conjunto de SNPs que definen el haplogrupo de ADNmt X.

Objetivo 2

El análisis del perfil de *SNPs* que definen los haplogrupos de ADNmt indicó que los clones de cada uno de los cíbridos, eran portadores del mismo haplogrupo de ADNmt que el del donante a partir del cual fueron generados, habiendo perdido en todos los casos los *SNPs* característicos del haplogrupo de ADNmt X (Figura 13).

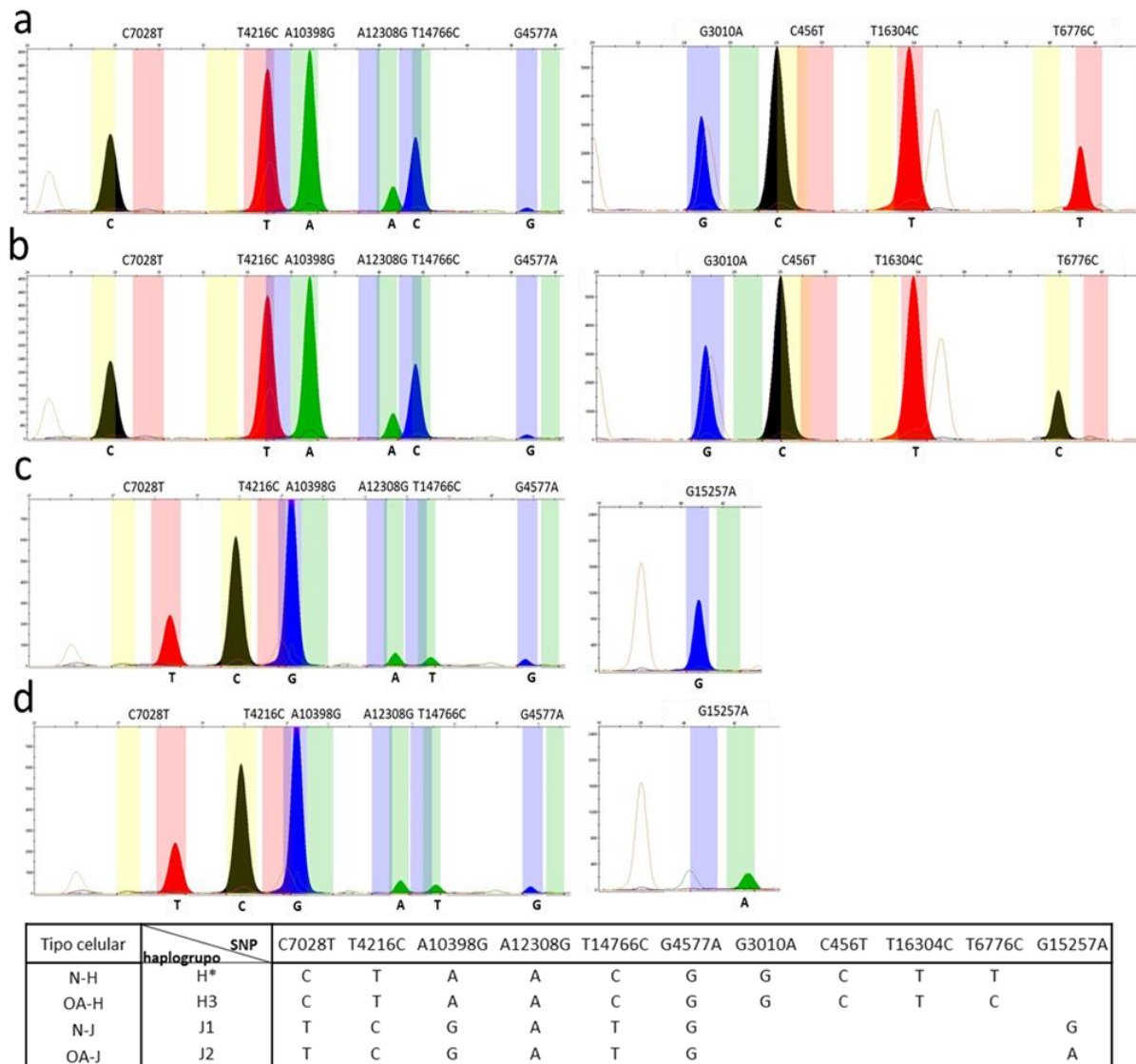


Figura 13 Electroferogramas obtenidos tras el haplogrupado de las muestras. En la imagen se observan los diferentes picos correspondientes a cada *SNP* en el sitio polimórfico interrogado. **(a)** Haplogrupo de ADNmt correspondiente a los cíbridos N-H (H*). **(b)** Haplogrupo de ADNmt correspondiente a los cíbridos OA-H (H3). **(c)** Haplogrupo de ADNmt correspondiente a los cíbridos N-J (J1). **(d)** Haplogrupo de ADNmt correspondiente a los cíbridos OA-J (J2).

Objetivo 2

1.2 Estabilización y determinación del número de copias de ADNmt

Antes de poder realizar la caracterización del modelo celular, es necesario seleccionar aquellos clones que consiguen reestablecer su número de copias de ADNmt, así como mantenerlo estable a lo largo de los pases de cultivo.

El análisis del número de copias de ADNmt nos permitió establecer que, al menos cuatro clones aislados por fusión, reestablecieron el contenido de su genoma mitocondrial. Los datos obtenidos reflejaron la estabilización del número de copias de ADNmt de cada uno de los clones a partir del pase de cultivo número 24 (Figura 14 a). Además, los resultados mostraron que, entre los pases 24 y 30, todos los híbridos alcanzaron un número estable de copias de ADNmt y que estos valores se mantuvieron en el tiempo (Figura 14 b y c).

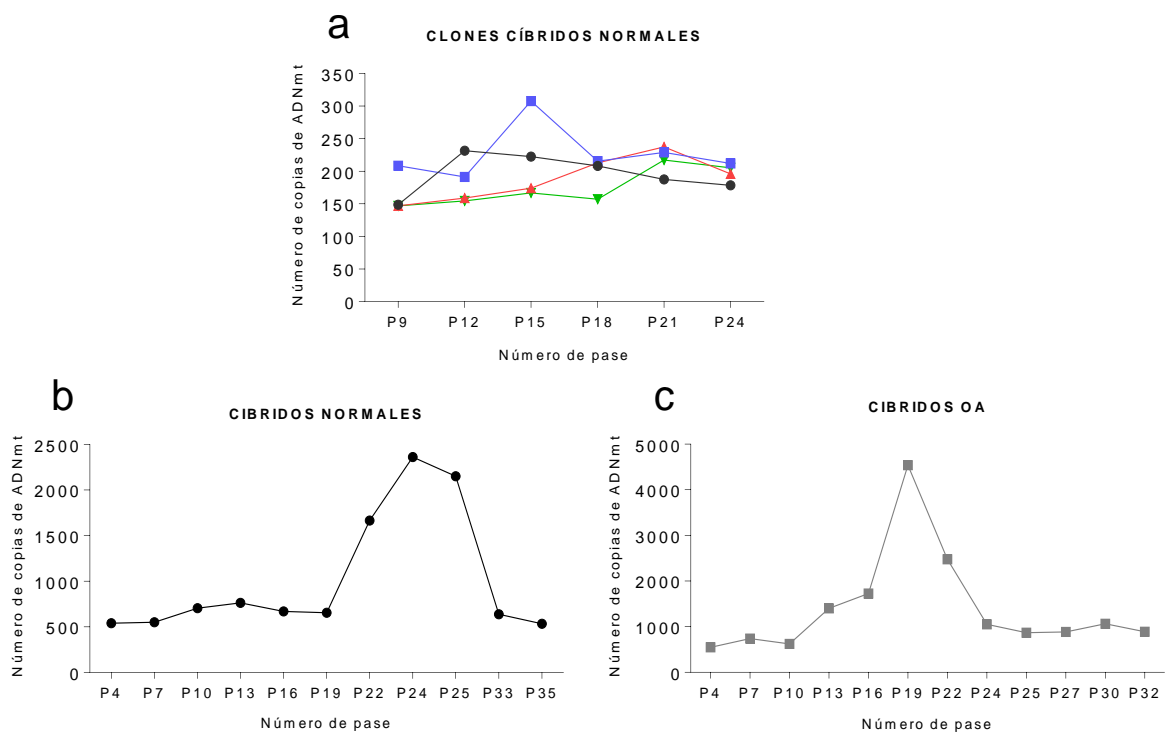


Figura 14 Representación gráfica de la estabilización del número de copias de ADNmt. **(a)** Clones obtenidos a partir de la fusión con el donante N-J. **(b)** Híbridos N. **(c)** Híbridos OA. Se representa como el ratio *ARNr12S/RNaseP* frente a los diferentes pases de cultivo.

Objetivo 2

Con el objetivo de conocer si los cíbridos generados presentaban diferencias en la capacidad de replicación de la maquinaria mitocondrial, se determinó y analizó el número de copias de ADNmt entre los diferentes cíbridos.

Los datos obtenidos al realizar el análisis entre cíbridos N y OA, reflejaron que los cíbridos OA presentan un aumento significativo del número de copias de ADNmt en comparación con los N (OA $717,5 \pm 372,6$ vs N $485,3 \pm 214,2$, $p \leq 0,01$) (Figura 15 a).

Cuando el análisis se realizó clasificando los cíbridos en función del haplogrupo de ADNmt, los datos reflejaron que los OA-H y OA-J presentan un mayor número de copias de ADNmt al compararlos con los N-H y N-J respectivamente (OA-H $637,2 \pm 367,1$ vs N-H $426,6 \pm 236,9$ $p \leq 0,05$; OA-J $829,9 \pm 362,5$ vs N-J $559,7 \pm 159,4$ $p \leq 0,01$). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los haplogrupos de ADNmt N-H y N-J, ni entre OA-H y OA-J (Figura 15 b).

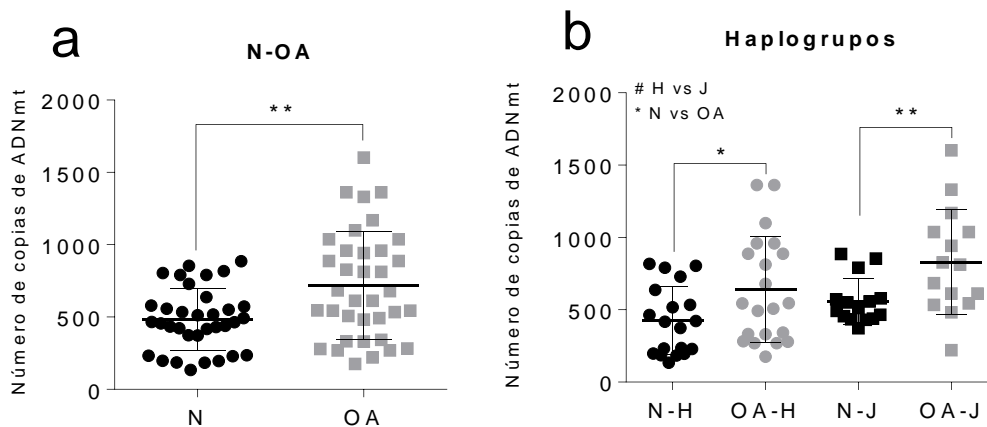


Figura 15 Número de copias de ADNmt. (a) Comparación entre los cíbridos N y OA. (b) Comparación entre los haplogrupos de ADNmt H y J (N-H, N-J, OA-H y OA-J). Los datos se representan como una media \pm DE. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J.

En base a estos resultados, se seleccionaron 2 clones por cíbrido y todos los experimentos posteriores se realizaron tras haber alcanzado al menos el pase 30 de cultivo.

Objetivo 2

2.- Estudio de la morfología celular bajo diferentes condiciones de cultivo

El empleo de la glucosa *in vitro* a una concentración de 4,5 gr/L está ampliamente aceptado, sin embargo, recientemente se ha abierto una amplia discusión ya que esta concentración es demasiado elevada y no se corresponde con las concentraciones fisiológicas (112, 113). Además, algunos autores describen el efecto *Crabtree* como aquel en el que la función celular respiratoria se puede inhibir o alterar por una alta concentración de nutrientes, lo que podría aumentar el Ca^{2+} citoplasmático afectando al metabolismo celular (103, 114).

Otro metabolito ampliamente estudiado y que además juega un papel relevante en el metabolismo celular es el piruvato. Este metabolito se obtiene al final de la glucólisis y es el primero de la vía del ciclo de Krebs. Al eliminar este sustrato del medio, las células se ven obligadas a utilizar la vía glucolítica hasta el final al no obtenerlo directamente del medio para producir energía (115).

En base a lo descrito anteriormente y a la importancia de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo a la hora de evaluar el comportamiento celular, los cíbridos se crecieron en medio de cultivo estándar (*DMEM* 4,5 gr/L) y en otro con una concentración de glucosa más baja (*DMEM* 1 gr/L), así como, en presencia o ausencia de piruvato. Además, dado que el cartílago es considerado un tejido mayormente hipóxico, estas condiciones se evaluaron en normoxia e hipoxia.

En paralelo, la línea celular 143B.TK⁻ se creció bajo las mismas condiciones de cultivo que los cíbridos y el análisis de las imágenes reveló que estas células no experimentan un cambio fenotípico al crecerlas con diferentes sustratos nutricionales. Tras el análisis de las imágenes obtenidas a partir de los cíbridos cultivados en las diferentes condiciones de cultivo, se observó que no presentan cambios fenotípicos siguiendo un patrón morfológico similar al observado en la

Objetivo 2

línea celular parental 143B.TK-. Del mismo modo, esta ausencia de cambios fenotípicos se mantiene al crecer las células en hipoxia, tal como se refleja en la Figura 16.

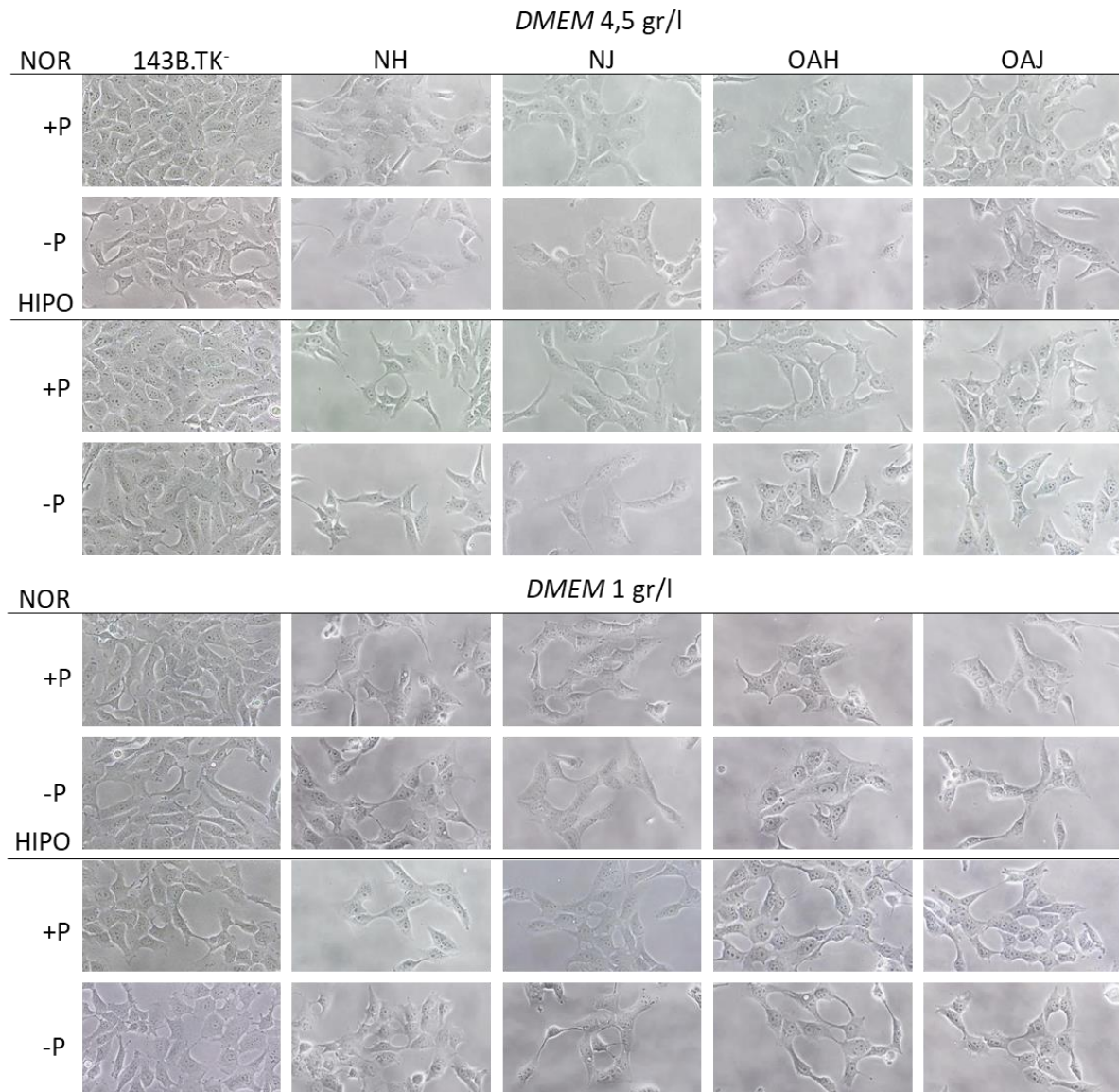


Figura 16 Imágenes de microscopía óptica de cíbridos tras 48 h de cultivo en diferentes condiciones de cultivo. (magnificación 200). +P: con piruvato. -P: sin piruvato. NOR: normoxia. HIPO: hipoxia.

Para comprobar que la ausencia de cambio fenotípico al crecer las células en condiciones de estrés no es característico de este modelo celular, se realizó el mismo ensayo en condrocitos de cultivo primario. Para ello, se aislaron condrocitos de un paciente OA de cadera siguiendo la metodología descrita por Blanco y colaboradores con modificaciones de Crawford y Dickinson (116, 117).

Objetivo 2

Brevemente, una vez obtenido el cartílago de la cabeza del fémur (cadera), las células se obtuvieron mediante filtración tras una digestión mecánica y una digestión química con Tripsina 1X durante 10 min a 37°C y colagenasa de tipo IV (2 mg/ml) (Sigma-Aldrich) durante 16 h a 37°C. Finalmente, las células se expandieron en *DMEM* 4,5 gr/L glucosa, suplementado con 10% de SBF y P/E.

Una vez aislados los condrocitos, se crecieron en las mismas condiciones de cultivo que los cíbridos para analizar su morfología. El análisis de las imágenes mostró que la morfología de este tipo celular tampoco se ve afectada cuando se cultivan en normoxia con diferentes concentraciones de glucosa (Figura 17).

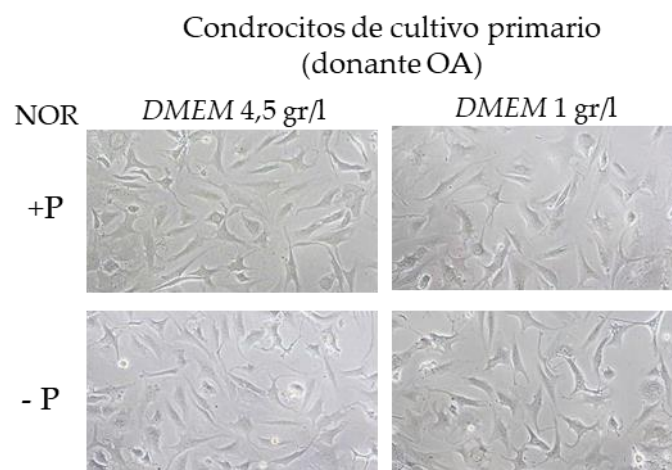


Figura 17 Imágenes de microscopía óptica de condrocitos tras 48 h de cultivo en diferentes condiciones. (magnificación 100). +P: con piruvato. -P: sin piruvato. NOR: normoxia.

3.- Determinación del crecimiento celular y el TD

Ya que durante el desarrollo del presente trabajo se evaluarán diferentes parámetros donde la mitocondria juega un papel esencial, es importante definir el tiempo de cultivo óptimo al cual la tasa de crecimiento celular no se ve afectada por las diferentes condiciones de cultivo descritas anteriormente, evitando, de esta manera, una posible alteración en los resultados obtenidos.

Para definir el tiempo de cultivo óptimo, se determinó la tasa de crecimiento celular durante 96 h de cultivo y, teniendo en cuenta este parámetro, se calculó el

Objetivo 2

TD de la población celular a partir de las 48 h. Ambos parámetros fueron evaluados en las diferentes condiciones de cultivo donde lo que se variaron fueron las concentraciones de nutrientes (glucosa y presencia o ausencia de piruvato) y los porcentajes de O₂ (normoxia (5% CO₂) e hipoxia (5% de O₂ y de CO₂)).

El análisis de la tasa de crecimiento y el TD entre los cíbridos N y OA crecidos en presencia de glucosa a una concentración de 4,5 gr/L tanto en normoxia como en hipoxia, mostró diferencias estadísticamente significativas en ambos parámetros a partir de las 96 h, siendo los cíbridos N los que reflejaron un crecimiento mayor que los OA (Tabla 11) (Anexo II- Figura 1).

Tabla 11 Resultados obtenidos en cada condición de cultivo para cada uno de los puntos de la tasa de crecimiento estudiados.

	<i>tiempo</i> (h)	<i>DMEM 4,5 +P</i>		<i>DMEM 4,5 -P</i>	
		N	OA	N	OA
<i>NOR</i>	24	7,75±1,92	6,03±2,40	7,44±2,10	4,69±1,02
	48	17,17±4,76	15,81±6,45	14,56±2,06	8,66±2,50
	72	35,33±6,55	31,28±9,27	34,92±6,35	20,69±8,02
	96	76,28±14,37	54,91±22,47	76,75±12,20	33,94±14,62
<i>HIPO</i>	24	7,72±2,37	6,22±1,77	7,67±1,69	5,52±1,60
	48	19,25±6,60	15,47±5,13	16,78±7,40	10,94±1,82
	72	49,72±11,87	37,94±13,71	34,61±10,16	25,78±5,32
	96	109,11±20,53	66,15±26,88	70,72±17,92	47,53±12,38
		<i>DMEM 1 +P</i>		<i>DMEM 1 -P</i>	
		N	OA	N	OA
<i>NOR</i>	24	6,97±2,20	7,41±3,67	6,91±1,56	6,61±1,90
	48	20,19±4,96	13,81±4,72	15,98±5,28	13,04±5,08
	72	40,89±4,83	15,53±7,79	33,71±11,09	19,50±7,18
	96	51,94±10,87	25,91±15,49	62,42±17,65	31,04±10,66
<i>HIPO</i>	24	8,61±1,89	7,84±1,93	7,52±1,66	5,54±0,89
	48	20,86±4,67	13,81±6,49	18,50±7,09	13,17±3,03
	72	42,58±8,99	19,19±9,65	39,23±7,72	25,58±3,81
	96	61,58±11,58	25,88±14,12	69,35±21,38	34,96±10,24
		<i>DMEM 4,5 +P</i>			
		N-H	N-J	OA-H	OA-J
<i>NOR</i>	24	8,21±2,13	6,83±1,28	4,69±2,18	7,38±1,96
	48	17,29±3,57	16,92±7,67	16,56±7,89	15,06±5,79
	72	35,67±5,73	34,67±9,4	29,88±9,45	32,69±10,3
	96	79,5±13,53	69,83±16,56	54,38±23,42	55,44±25,07

Objetivo 2

HIPO	24	7,67±2,17	7,83±3,26	5,75±1,51	6,69±2,11
	48	20,54±7,3	16,67±5,11	16,38±5,7	14,56±5,17
	72	51,46±11,63	46,25±14,1	36,63±16,16	39,25±13,14
	96	108,5±22,99	110,42±19	65,13±22,3	67,19±34,44
DMEM 4,5 -P					
		N-H	N-J	OA-H	OA-J
NOR	24	8,33±1,79	5,67±1,59	4,06±0,7	5,31±0,9
	48	15,42±1,93	12,83±1,01	9,38±2,26	7,94±2,75
	72	37,21±5,36	30,33±6,49	16,75±1,78	24,63±10,28
	96	76,42±12,87	77,42±13,42	33,5±8,17	34,39±20,76
HIPO	24	7,96±1,76	7,08±1,23	4,88±1,69	6,16±1,43
	48	17,13±5,16	16,08±12,29	10,44±1,66	11,44±2,08
	72	39,33±7,87	25,17±7,57	23,94±2,73	27,63±7,04
	96	71,42±19,24	69,33±18,85	43±14,02	52,06±10,32
DMEM 1 +P					
		N-H	N-J	OA-H	OA-J
NOR	24	7,71±2,23	5,5±1,39	5,81±1,59	9±4,69
	48	22±3,29	16,58±6,48	11,94±3,48	15,69±5,5
	72	41,17±5,3	40,33±4,73	11,25±2,37	19,81±9,33
	96	50,71±12,51	54,42±8,22	17,88±8,81	33,94±17,6
HIPO	24	9,5±1,36	6,38±1,61	7,56±1,77	8,13±2,31
	48	22,25±4,96	18,08±3,88	10,56±1,42	17,06±8,25
	72	43,13±10,67	41,5±6	14,25±2,99	24,13±11,97
	96	62,38±13,66	60±8,05	18,19±7,36	33,56±15,93
DMEM 1 -P					
		N-H	N-J	OA-H	OA-J
NOR	24	6,91±1,57	6,91±1,7	6,41±1,87	6,8±2,33
	48	15,33±6,67	16,63±3,98	12,33±5,13	13,75±6,06
	72	37,13±14,66	30,29±5,25	22,52±5	16,5±8,77
	96	69,17±11,24	55,67±21,21	34,67±9,97	27,42±12,06
HIPO	24	7,08±1,03	7,96±2,13	6,08±1,01	4,99±0,26
	48	15,58±4,13	21,42±8,56	13,58±4,4	12,75±1,73
	72	40,29±7,07	38,17±8,86	26,58±4,37	24,58±3,76
	96	81,25±21,72	57,46±13,93	31,83±6,51	38,08±13,8

Valores presentados como media ± DE (nº células x10⁴). Valor en negro: estadísticamente significativo. Valor en gris: no significativo. NOR: normoxia. HIPO: hipoxia. +P: con piruvato. -P: sin piruvato.

Cuando los cíbridos se crecieron en las mismas condiciones, pero sin piruvato en el medio, el análisis del crecimiento y el TD reflejaron que, ya desde las primeras 24 h en cultivos, los cíbridos OA mostraron una tasa de crecimiento estadísticamente menor que los N y, por tanto, un tiempo de duplicación mayor (Anexo II-Figura 1).

Objetivo 2

Al crecer las células en baja concentración de glucosa (1 gr/L), tanto en presencia como ausencia de piruvato, así como en condiciones de normoxia e hipoxia, fueron los híbridos OA los que mostraron una menor tasa de crecimiento que los N, acentuándose estas diferencias a partir de las 72 h (Anexo II-Figura 1).

Este mismo estudio se realizó clasificando los híbridos N y OA en función del haplogrupo de ADNmt obteniéndose 4 grupos diferentes (N-H, N-J, OA-H y OA-J) y comparando entre los haplogrupos de ADNmt H y J. El análisis de la tasa de crecimiento y TD en las cuatro condiciones de cultivos estudiadas reflejó que no hay diferencias ni en la tasa de crecimiento ni en el TD. En todos los análisis comparativos realizados, únicamente se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de crecimiento entre los N-H y N-J cuando se crecieron durante 72 con *DMEM* 4,5-P en hipoxia (Anexo II-Figura 2).

Teniendo en cuenta el análisis de los resultados descritos en la Tabla 11, el tiempo de cultivo seleccionado para la realización de los experimentos posteriores fueron las 48 h, ya que, al incrementar el tiempo de cultivo, la tasa de crecimiento se vuelve estadísticamente significativa y los híbridos OA presentaron un menor crecimiento en condiciones de cultivo nutricionalmente restrictivas.

4.- Actividad de la enzima citrato sintasa (CS) y los complejos de la cadena de transporte electrónico (CTE)

El estado de la CTE, en el modelo celular de híbridos mitocondriales, se determinó analizando la actividad de enzimas implicadas en su correcto funcionamiento tras crecer las células tanto en presencia como en ausencia de piruvato.

El análisis de los resultados obtenidos de la AE de la enzima CS entre los híbridos mostró una tendencia en los híbridos OA a presentar menor actividad enzimática

Objetivo 2

que los N. Al crecer las células en ausencia de piruvato se mantuvo la misma tendencia. La actividad de la CS no se vio modulada significativamente en ninguna de las condiciones testadas (Figura 18 a). Del mismo modo, el análisis realizado entre los haplogrupos de ADNmt H y J no reflejó ninguna diferencia en la actividad de la CS (Figura 18 b).

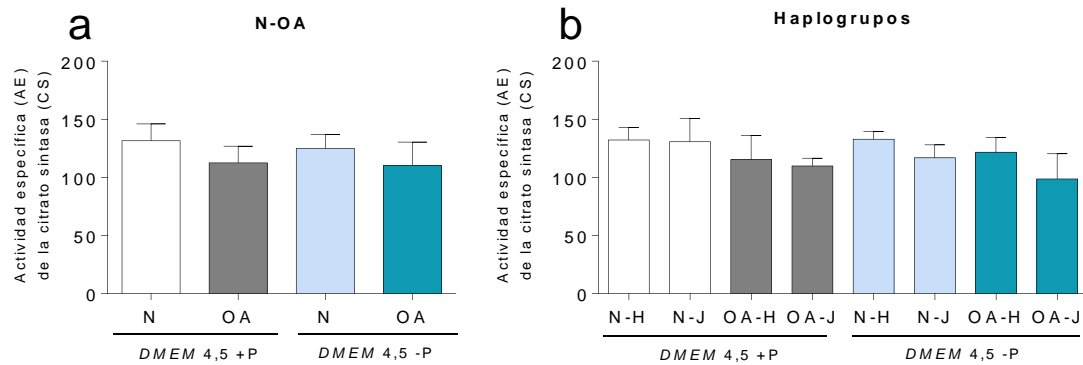


Figura 18 Determinación de la actividad específica (AE) de la enzima citrato sintasa (CS). **(a)** Comparación entre híbridos N y OA. **(b)** Comparación entre haplogrupos de ADNmt H o J. Los datos se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. * híbridos N y OA. \$ + y - P (piruvato). # haplogrupos de ADNmt H y J. DMEM +P: blanco (N) y gris (OA). DMEM -P: azul claro (N) y oscuro (OA).

Los datos de la actividad enzimática de los complejos de la CTE se relativizaron frente a los obtenidos para la enzima CS. Así, tras el análisis comparativo de actividad de los 4 complejos de la CTE, los resultados mostraron que entre híbridos N y OA, únicamente existen diferencias en la actividad del complejo IV. Los híbridos N presentaron una menor actividad del complejo IV, siendo esta diferencia estadísticamente significativa al incubar las células en ausencia de piruvato (N $25,73 \pm 3$ vs OA $31,17 \pm 3,4$ $p \leq 0,05$) (Figura 19 d).

Objetivo 2

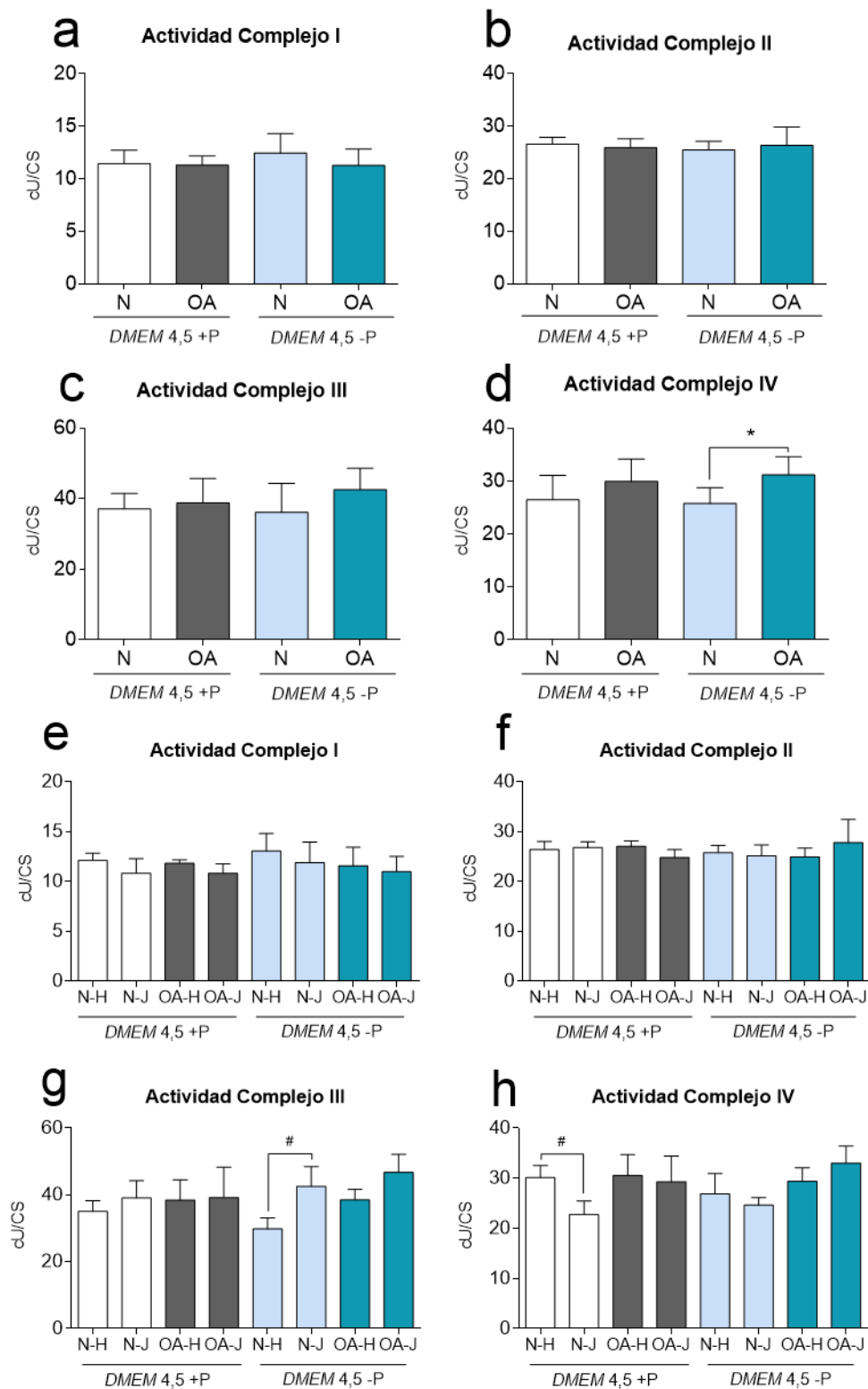


Figura 19 Actividad enzimática (cU) de los complejos de la CTE. Complejo I (a), II (b), III (c) y IV (d) en cíbridos N y OA. Complejo I (e), II (f), III (g) y IV (h) en haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como la media ± DE de tres experimentos independientes relativizados frente la AE (CS). * p<0,05 cíbridos N y OA. \$ + y - P (piruvato). # p<0,05 haplogrupos de ADNmt H y J. DMEM +P: blanco (N) y gris (OA). DMEM -P: azul claro (N) y oscuro (OA).

Objetivo 2

Con el objetivo de evaluar si el haplogrupo de ADNmt juega un papel importante en la modulación de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, se analizaron las diferencias entre los haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos reflejaron diferencias en la actividad del complejo III al crecer las células en ausencia de piruvato, siendo los híbridos N-H los que presentaron una menor actividad al compararlo con los N-J (**N-H** $29,77 \pm 3,35$ vs **N-J** $42,50 \pm 5,91$ $p \leq 0,05$) (Figura 19 g). Mientras que los híbridos N-H crecidos en presencia de piruvato presentaron una mayor actividad del complejo IV al compararlos con los N-J (**N-H** $30,13 \pm 2,39$ vs **N-J** $22,77 \pm 2,69$ $p \leq 0,05$) (Figura 19 h).

5.- Estado de la red mitocondrial de los híbridos

Teniendo en cuenta que el modelo celular utilizado difiere únicamente en el ADNmt, se analizó si el crecimiento celular en presencia o ausencia de piruvato afectaba a la morfología y/o distribución de la red mitocondrial.

5.1 Estudio de la distribución de la masa mitocondrial

El estudio de la distribución mitocondrial se llevó a cabo a través del análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal tras la tinción de los híbridos con Mitotraker® Red, fluoróforo que entra en las mitocondrias a favor de potencial, permitiendo visualizar la distribución de la red mitocondrial por el citoplasma celular.

El análisis de las imágenes permitió observar que, la red de mitocondrias de los híbridos OA presenta una localización más perinuclear, mientras que en los híbridos N, esta red se ve distribuida por el citoplasma y las mitocondrias parecen tener una forma más tubular (Figura 20 a). El análisis de la intensidad de fluorescencia de las imágenes obtenidas mostró que los híbridos OA tenían una menor intensidad de fluorescencia que los N (**OA** $14,37 \pm 10,04$ vs **N** $33 \pm 10,47$ $p \leq 0,01$) (Figura 20 b). Este valor se puede relacionar con una menor masa mitocondrial en

Objetivo 2

los cíbridos OA. Asimismo, con las imágenes obtenidas clasificando las células en función de los haplogrupos de ADNmt, se observa que las células OA portadoras del haplogrupo de ADNmt H o J presentan un patrón de distribución de la masa mitocondrial diferente al observado en los cíbridos N (Figura 20 c).

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las células marcadas con Mitotraker® *Red* mediante citometría de flujo, mostraron que los cíbridos N tienen niveles de intensidad de fluorescencia significativamente más altos que los OA cuando las células se crecieron en *DMEM* 4,5 +P (N 89,50±20,54 vs OA 74,75±14,86 $p \leq 0,05$). Ambos cíbridos (N y OA), experimentaron un incremento estadísticamente significativo de la masa mitocondrial cuando el piruvato se retiró del medio de cultivo (N +P 89,50±20,54 vs -P 105,1±21,45 $p \leq 0,05$; OA +P 74,75±14,86 vs -P 124,1±22,81 $p \leq 0,0001$). Al analizar la intensidad de fluorescencia cuando el piruvato se retiró del medio de cultivo entre N y OA, los cíbridos OA mostraron unos valores más elevados que los N (OA 124,1±22,81 vs N 105,1±21,45 $p \leq 0,05$) (Figura 20 d).

Ya que también queremos estudiar si el haplogrupo de ADNmt juega un papel en la distribución de la red mitocondrial, se realizó un análisis en función de los haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos mostraron que no hay diferencias entre ellos. Sin embargo, cuando se compararon los cíbridos crecidos en presencia y en ausencia de piruvato entre sí, se observó que los cíbridos OA (tanto los OA-H como los OA-J) incrementan de forma estadísticamente significativa la intensidad de fluorescencia al ser crecidos en ausencia de piruvato (OA-H +P 76,64±9,38 vs OA-H -P 117,8±19,04 $p \leq 0,01$; OA-J +P 72,86±19,73 vs OA-J -P 129,6±25,76 $p \leq 0,01$) (Figura 20 e).

Objetivo 2

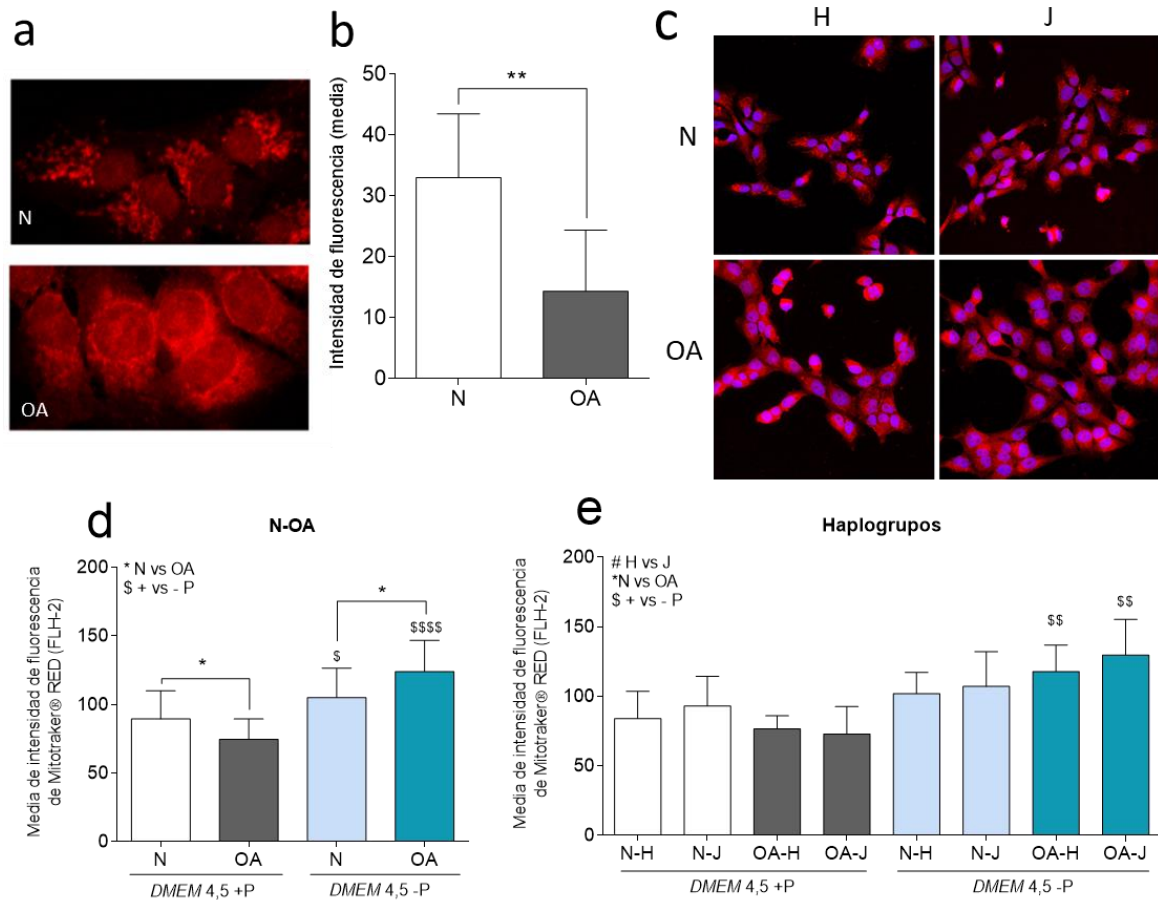


Figura 20 Determinación de la masa mitocondrial mediante marcaje con MitoTracker® Red en híbridos. **(a)** Imágenes tomadas mediante microscopía confocal, representativas de cada uno de los grupos a estudio (N y OA), magnificación 200. **(b)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de MitoTracker® Red por área (3 áreas por grupo) de las imágenes tomadas mediante microscopía confocal. **(c)** Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal representativas de cada uno de los híbridos N-H, N-J, OA-H y OA-J donde el color rojo se corresponde con la red mitocondrial (MitoTracker® Red) y el color azul con los núcleos de las células (Hoechst), magnificación 100. **(d-e)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de MitoTracker® Red mediante citometría de flujo en híbridos N y OA **(d)** portadores del haplogrupo de ADNmt H o J **(e)** crecidos en + o – piruvato (P). Los datos se representan como media ± DE de cuatro experimentos independientes. * p≤0,05; ** p≤0,01 híbridos N y OA. \$ p≤0,05; \$\$ p≤0,01; \$\$\$\$ p≤0,0001 + y – P (piruvato). # haplogrupos de ADNmt H y J. DMEM +P: blanco (N) y gris (OA). DMEM -P: azul claro (N) y oscuro (OA).

5.2 Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

En base a los datos obtenidos anteriormente y teniendo en cuenta que el Mitotraker® Red también puede ser utilizado como una medida indirecta del $\Delta\Psi_m$, ya que difunde a través de la membrana mitocondrial en función del estado del $\Delta\Psi_m$, se desarrolló otra metodología más específica utilizando DilC1 (5) con el objetivo de analizar este parámetro en los híbridos.

Objetivo 2

5.2.1 Puesta a punto de un control positivo para el estudio de la despolarización de la membrana mitocondrial

Antes de medir el estado del $\Delta\Psi_m$ en el modelo celular, se llevó a cabo una puesta a punto para definir un control positivo que indujera despolarización mitocondrial en los cíbridos. Para ello, se testaron diferentes sustancias que inducen la despolarización: Oligo, FCCP y estaurosporina, incubando los cíbridos OA con diferentes concentraciones y tiempos.

El análisis de los datos reflejó que el porcentaje de población celular positiva para el fluoróforo *DilC1(5)* no se vio alterada tras la incubación con Oligo durante 60 min en ninguna de las dos concentraciones testadas (2,5 y 5 $\mu\text{l/ml}$). Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos tras la incubación de FCCP a una concentración de 1 μM durante 90 y 120 min. La presencia de estaurosporina a 2 μM disminuyó significativamente el número de células positivas para *DilC1(5)* tras 60 y 90 min de incubación (**Basal** $1\pm 0,09$ vs **60'** $0,5\pm 0,01$; vs **90'** $0,51\pm 0,11$ $p\leq 0,05$) (Figura 21).

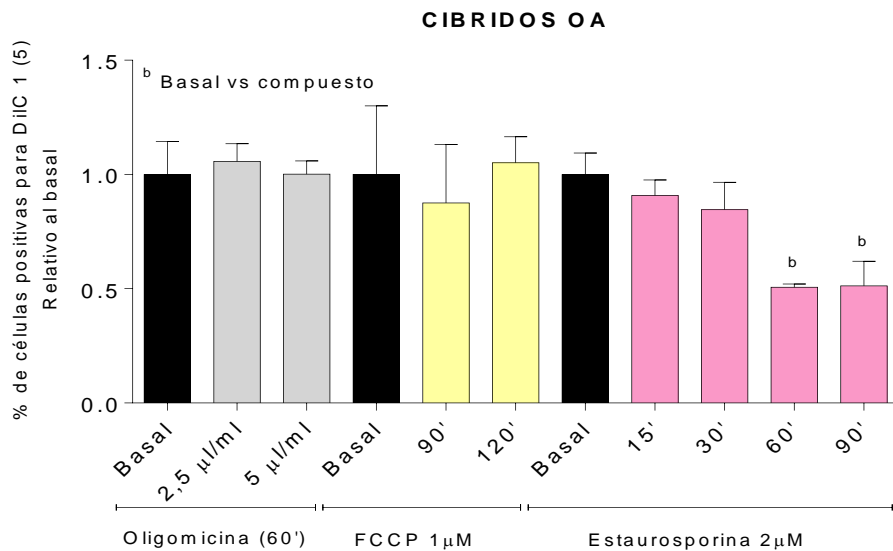


Figura 21 Porcentaje (%) de células positivas para *DilC1(5)* en relación a su condición basal tras incubarlas con oligomicina (gris), FCCP (amarillo) y estaurosporina (rosa) mediante citometría de flujo. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. b $p\leq 0,05$ compuesto y la condición basal. ': minutos.

Objetivo 2

Teniendo en cuenta que la estaurosporina es un inductor de apoptosis, ya que durante este proceso produce una disminución del $\Delta\Psi_m$ debido a una ruptura del metabolismo energético, la incubación provocó al mismo tiempo una disminución significativa del $\Delta\Psi_m$ pero una elevada mortalidad celular, por lo que se descartó su uso para evaluar el $\Delta\Psi_m$. Debido a ello, la incubación con FCCP durante 90 min se escogió como control positivo para este modelo (Figura 21).

5.2.2 Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Con el objetivo de analizar las diferencias a nivel del $\Delta\Psi_m$ utilizando DilC1 (5) entre los cíbridos N y OA portadores de los haplogrupos de ADNmt H y J se incubaron las células con FCCP durante 90 min.

Los resultados obtenidos mostraron que los cíbridos OA tienen un porcentaje de células despolarizadas significativamente mayor que los N tras 90 min de incubación con FCCP (OA $71,68 \pm 11,48$ vs N $56,98 \pm 16$ $p \leq 0,05$) (Figura 22 a). El análisis realizado en función de los haplogrupos de ADNmt H y J reflejó que los cíbridos N-J tienden a presentar un menor porcentaje de células despolarizadas que los demás cíbridos (N-H, OA-H y OA-J) (Figura 22 b).

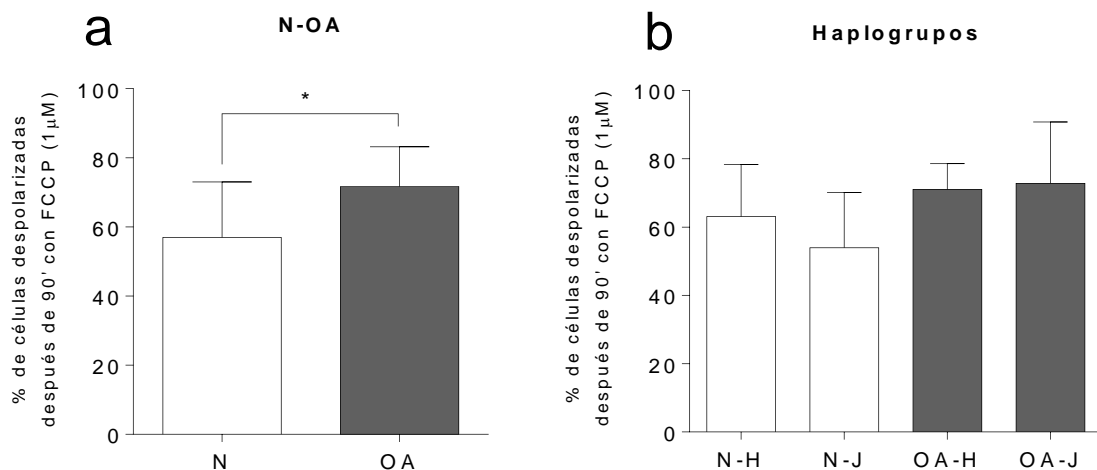


Figura 22 Porcentaje (%) de células despolarizadas tras la incubación con FCCP a $1\mu\text{M}$ durante 90 min. **(a)** Comparación entre cíbridos N y OA. **(b)** Comparación entre haplogrupos de ADNmt H o J. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J.

Objetivo 2

5.3 Biogénesis mitocondrial: niveles de expresión génica

Dado que el análisis de la masa mitocondrial mostró diferencias entre los híbridos N y OA, se analizó la biogénesis mitocondrial cultivando las células en normoxia, así como, en presencia o ausencia de piruvato.

La biogénesis mitocondrial es un proceso celular complejo por el cual se originan nuevos orgánulos mitocondriales, lo que conlleva la replicación del ADNmt y la síntesis y ensamblaje de nuevas proteínas, dando lugar a un incremento en el contenido mitocondrial (118, 119). El *peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC-1 α)* regula la biogénesis mitocondrial mediante la inducción del *nuclear respiratory factor 1 (NRF1)*, que controla la transcripción de genes nucleares requeridos para la respiración, transcripción y replicación del genoma mitocondrial (119). *NRF1* induce la expresión génica del *TFAM* y otras enzimas implicadas en la CTE mitocondrial (88, 120). *TFAM*, que posteriormente es translocado a la mitocondria, es un componente esencial en la formación de la estructura nucleoide que, a su vez, da lugar al inicio de la transcripción y replicación del ADNmt favoreciendo el proceso de biogénesis mitocondrial (121).

El análisis de los niveles de expresión de *PGC-1 α* mostró que no hay diferencias entre los híbridos N y OA (Figura 23 a). El análisis de los niveles de expresión de *PGC-1 α* llevado a cabo en función de los haplogrupos de ADNmt H y J reflejó que únicamente existen diferencias entre los híbridos OA-H y OA-J, mostrando un incremento de la expresión en los OA-J en condición sin piruvato (-P OA-H $1,03\pm 0,25$ vs OA-J $1,34\pm 0,22$ $p\leq 0,05$) (Figura 23 b).

Los niveles de expresión de *NRF1* mostraron un incremento en los híbridos N en comparación con los OA en todas las condiciones testadas (+P N $1,46\pm 0,49$ vs OA $1,01\pm 0,30$ $p\leq 0,05$; -P N $1,52\pm 0,59$ vs OA $0,90\pm 0,30$ $p\leq 0,01$) (Figura 23 c). A la hora de evaluar su expresión entre los haplogrupos de ADNmt, no se observaron diferencias entre los grupos a estudio (Figura 23 d).

Objetivo 2

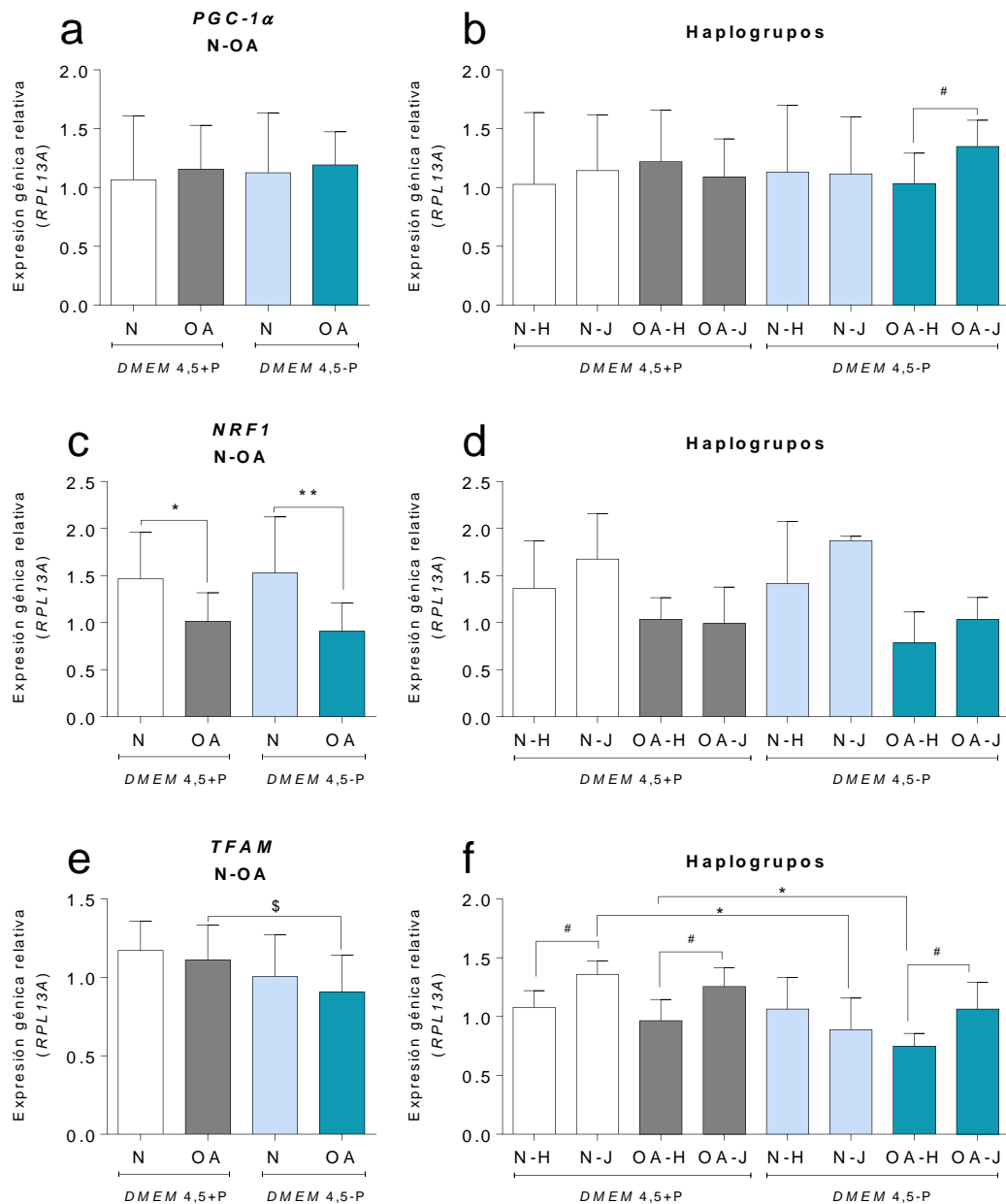


Figura 23 Expresión génica de enzimas implicadas en la biogénesis mitocondrial. (a-b) *PGC-1α*, (c-d) *NRF1* y (e-f) *TFAM* en híbridos N y OA portadores de los haplogrupos de ADNmt H o J crecidos en presencia (+) o ausencia (-) de piruvato (P). Los resultados se expresan media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ híbridos N y OA. \$ $p \leq 0,05$ + y - P. # $p \leq 0,05$ haplogrupos de ADNmt H y J. DMEM +P: blanco (N) y gris (OA). DMEM -P: azul claro (N) y oscuro (OA).

El análisis de los niveles de expresión de *TFAM* no reflejó diferencias entre los híbridos N y OA, sin embargo, los niveles de expresión de este gen se vieron estadísticamente reducidos en los híbridos OA al eliminar el piruvato (OA +P 1,11 \pm 0,22 vs -P 0,91 \pm 0,24 $p \leq 0,05$) (Figura 23 e).

Objetivo 2

El análisis de los niveles de *TFAM* en función del haplogrupo de ADNmt, reflejó que los cíbridos N-J y OA-J incrementaron significativamente la expresión de este gen al compararlos con los cíbridos N-H y OA-H respectivamente (**+P N-J** $1,35\pm 0,11$ vs **N-H** $1,07\pm 0,14$, **OA-J** $1,25\pm 0,15$ vs **OA-H** $0,96\pm 0,18$ $p\leq 0,05$; **-P OA-J** $1,06\pm 0,22$ vs **OA-H** $0,74\pm 0,10$ $p\leq 0,05$) (Figura 23 f). Además, al crecer las células en ausencia de piruvato, la expresión de este gen disminuyó significativamente en los cíbridos N-J y OA-H (**N-J +P** $1,35\pm 0,11$ vs **-P** $0,88\pm 0,26$ $p\leq 0,05$; **OA-H +P** $0,96\pm 0,18$ vs **-P** $0,74\pm 0,10$ $p\leq 0,05$) (Figura 23 f).

Objetivo 2

Durante los últimos años, se ha puesto de manifiesto la asociación existente entre la OA y la disfunción mitocondrial, así como su asociación con los diferentes haplogrupos de ADNmt a través de estudios poblacionales (95, 122, 123). Hoy en día, sin embargo, los estudios funcionales donde se analice el papel real que juega la mitocondria y los haplogrupos de ADNmt tanto en la incidencia como en el desarrollo de esta enfermedad son escasos, encontrando solamente un trabajo donde se usaron cíbridos de pacientes N para demostrar la asociación entre los haplogrupos de ADNmt H y J con la OA (101). Con este antecedente, los cíbridos transmitocondriales parecen representar un modelo celular *in vitro* adecuado, ya que han sido ampliamente utilizados en numerosos estudios de patologías complejas donde la disfunción mitocondrial y mutaciones al nivel del ADNmt parecen tener una función importante en su patogénesis (63, 64, 66, 70).

Para la realización de la caracterización de los cíbridos generados (N-H, N-J, OA-H y OA-J) se seleccionaron 2 clones por fusión con el fin de minimizar cualquier variación genética, evitando así la posible dispersión en los datos y, aumentando la robustez del estudio ya que, como numerosos estudios describen, es necesario tener en cuenta la variabilidad interclonal puesto que los clones seleccionados no tienen por qué comportarse de la misma manera (12, 60, 61).

No todos los clones seleccionados tras la fusión llegan a alcanzar la estabilización del número de copias de ADNmt, pudiendo presentar un contenido de ADNmt *a priori* disfuncional y no apto para llevar a cabo los experimentos posteriores (103). De este modo, hasta que el número de copias de ADNmt no se estabilizó en los clones seleccionados, no se dio paso a la realización de los experimentos. La estabilización del número de copias de ADNmt óptima tras un proceso de cibridización se encuentra descrito en la literatura, siendo necesarios entre 20 y 25

Objetivo 2

pases de cultivo (60, 93, 124). Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los límites descritos, presentando la estabilización de los cíbridos entorno al pase 25-30, tras aproximadamente 3 meses de cultivo.

El análisis comparativo del contenido de ADNmt reflejó un aumento en cíbridos OA, lo que coincide con lo descrito en condrocitos OA, donde los autores explican este incremento en el número de copias como un mecanismo compensatorio de los OA a la hora de intentar paliar el daño que presentan en el ADNmt (125). Del mismo modo, entre los haplogrupos de ADNmt H y J no se encontraron diferencias concordando con lo descrito por Kenney y colaboradores, donde no observaron modulación en los niveles de ADNmt entre cíbridos portadores de estos 2 mismos haplogrupos de ADNmt (68). Sin embargo, otros autores sí observaron diferencias entre ellos, siendo los cíbridos J los que presentaron niveles más elevados (126). Estos datos contradictorios se deben quizás a que los cíbridos utilizados en cada estudio fueron generados a partir de metodologías diferentes y unas líneas *Rho-0* distintas. Por ello, esta discordancia entre resultados podría deberse a que, no solo el ADNmt influye en el número de copias, si no que el entorno fisiológico y la metodología utilizada pueden jugar también un papel importante (68, 127).

Teniendo en cuenta que el comportamiento de los cíbridos puede verse modulado tanto por el entorno fisiológico como por los requerimientos nutricionales, se analizó el efecto que diferentes condiciones de cultivo provocan en el comportamiento de cíbridos mitocondriales y si condicionan su respuesta en función de su ADNmt (60, 66, 68, 128, 129). En la literatura, la mayoría de estos estudios se centran en el crecimiento de estas células en presencia de glucosa o de galactosa, empleando este último como inductor de la CTE. Dado que el objetivo es generar un modelo para estudiar el papel que juega la mitocondria en la OA, se testaron diferentes concentraciones de glucosa, así como el efecto de la presencia o ausencia de piruvato en la modulación de la CTE. Además, ya que el ambiente articular es mayormente hipóxico, se evaluó la capacidad de respuesta celular bajo

Objetivo 2

diferentes porcentajes de oxígeno (80, 83). Todo esto permitió reproducir un escenario *in vitro* parecido a las condiciones del ambiente articular generando una situación de mayor esfuerzo metabólico.

En condiciones estándar de cultivo, las células no vieron modulada su tasa de crecimiento, sin embargo, cuando se sometieron a un ambiente diferente, el análisis mostró que los híbridos OA presentan una tasa de crecimiento menor que los N, sin observarse diferencias entre haplogrupos de ADNmt (H y J). Estos datos concuerdan con lo descrito en híbridos portadores de las mutaciones características de la enfermedad de LHON generados a partir de la línea celular 143B.TK- *Rho-0*, donde únicamente se observaron diferencias cuando las células se crecieron en una condición de mayor esfuerzo metabólico (galactosa) (66).

Otro estudio reflejó que al crecer las células en galactosa se desenmascara un crecimiento más lento en los híbridos patológicos (130). Si bien es cierto que la mayoría de los estudios se centran en cultivos con galactosa, como una condición que fuerza metabólicamente a la célula, crecer las células en una concentración menor de glucosa (1gr/L) o en ausencia de piruvato, puso de relevancia el funcionamiento diferencial que presenta la maquinaria celular en función del genoma mitocondrial de cada uno de los híbridos.

El análisis de la actividad enzimática, tanto de la CS como de los complejos de la CTE, proporciona una visión general del estado del funcionamiento mitocondrial, sin embargo, entre los diferentes híbridos, la actividad de la CS no se vio modulada. Es posible que los híbridos no muestren ninguna variación en este parámetro, del mismo modo que no presentaron ninguna variación en la tasa de crecimiento a las 48 h de cultivo ya que, como se describió en la literatura, existe una relación directa entre los niveles de CS, el crecimiento y la proliferación celular (131).

El análisis de la medida de la actividad de las enzimas implicadas en la CTE reflejó que únicamente la actividad del complejo IV se vio incrementada en los híbridos

Objetivo 2

OA al ser crecidos en ausencia de piruvato. La ausencia del piruvato crea un estado de mayor esfuerzo metabólico debido a que la célula necesita producir piruvato a través de la glucólisis para, finalmente, obtener energía mediante la CTE de la mitocondria (115). Esto podría explicar por qué los híbridos OA presentan mayor actividad de este complejo, ya que compensarían la ausencia de piruvato en el medio forzando el transporte de H^+ al espacio intermembrana para equiparar la obtención energía.

El análisis de la actividad de este complejo en función del haplogrupo de ADNmt reflejó que los N-J la presentaban disminuida frente a los N-H, poniendo de relevancia que los *SNPs* que definen el haplogrupo J (y en concreto el J1) localizados en este complejo condicionan en cierto modo su actividad. Si bien, es cierto que esta diferencia no se observó entre híbridos OA portadores de los diferentes haplogrupos de ADNmt. Por el contrario, la actividad del complejo IV se vio disminuida en los OA-J frente a los N-J, diferencia que posiblemente radica en que los OA-J son portadores del subhaplogrupo J2 cuya distribución de *SNPs* quizás no afecta de igual modo a la actividad del complejo IV (132).

El análisis de la actividad del complejo III se vio reducida únicamente en los N-H cuando se forzaron metabólicamente. Esta diferencia podría encontrar su explicación en el *SNP* que afecta al citocromo B característico del subhaplogrupo H* y, por tanto, disminuir su actividad cuando las células se ven obligadas a trabajar más para producir el mismo nivel de ATP.

Los datos de la distribución de la masa mitocondrial en los híbridos siguieron la misma línea que lo descrito en condrocitos, donde los OA muestran valores más bajos que los N (88).

A la hora de interpretar estos datos, junto con los obtenidos al analizar el número de copias de ADNmt, los resultados parecen ser contradictorios, sin embargo, se

Objetivo 2

debe tener en cuenta que, bajo una condición de esfuerzo metabólico, la capacidad replicativa del genoma mitocondrial se ve incrementada, lo que desencadena, *a posteriori*, el aumento de la masa mitocondrial (133).

Teniendo en cuenta que el MitoTracker® *Red* se describe como un fluoróforo cargado positivamente cuyo marcaje se puede ver alterado por el estado funcional de la mitocondria (134, 135), y que algunos autores plantean el empleo de otros fluoróforos que se unen directamente al orgánulo y no dependan de su $\Delta\Psi_m$, como por ejemplo el MitoTracker® *probes-green* (88, 134), hemos decidido utilizar otro fluoróforo para el análisis del $\Delta\Psi_m$ en nuestro modelo.

El análisis de este parámetro reveló una mayor disminución en los híbridos OA, dato que sigue la misma tendencia de numerosos trabajos, donde los híbridos portadores de ADNmt de diferentes patologías presentan mayor despolarización que los híbridos control en cada caso (64, 66, 136). Todos estos datos revelan un desequilibrio del $\Delta\Psi_m$ entre híbridos control y aquellos portadores de mitocondrias *a priori* disfuncionales.

Dentro de la disfunción de la mitocondria, la biogénesis de este orgánulo es uno de los primeros mecanismos que se encuentran alterados (91, 137). Los resultados obtenidos de *NRF1* reflejaron que los niveles de expresión de este gen se vieron reducidos en los híbridos OA en comparación con los N. Wang y colaboradores observaron que los niveles de expresión proteica de *PGC-1 α* , *NRF1* y *TFAM* estaban disminuidos en condrocitos artrósicos primarios (88). Del mismo modo, otros autores, describieron que la expresión proteica de *PGC-1 α* y *TFAM* se encontraba modulada en híbridos de Alzheimer en comparación con los controles, sin embargo, no observaron diferencias entre ambos grupos a la hora de estudiar los niveles de expresión génica siguiendo la misma línea descrita en este trabajo de tesis (64). Una posible explicación radica en que la actividad y estabilidad de la enzima *PGC-1 α* se regula de manera postraduccional, afectando también la

Objetivo 2

expresión de *NRF1* y *TFAM*, por ello, el estudio de procesos como acetilación y desacetilación por parte de SIRT1 o fosforilación mediante *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK), o ERK en el caso de *TFAM*, que inhiben o modulan positivamente la actividad de estas enzimas incrementando la biogénesis mitocondrial, sería interesante en un futuro (64, 119, 120).

A la hora de analizar estos datos en función del haplogrupo de ADNmt H o J, se observó que los cíbridos J tienden a presentar niveles de expresión de *PGC-1 α* , *NRF1* y *TFAM* más elevados que aquellos portadores del haplogrupo de ADNmt H. Hoy en día, se conoce que las mutaciones características del haplogrupo de ADNmt J confieren una menor eficiencia energética mitocondrial. Por ello, es posible que la biogénesis mitocondrial se encuentre aumentada en los cíbridos portadores de este haplogrupo de ADNmt con el objetivo de compensar el déficit de energía (101, 122, 128, 138).

El conjunto de los resultados aquí descritos apunta que los cíbridos portadores del ADNmt de donantes patológicos presentan la función mitocondrial comprometida a nivel celular. Además, la condición sin piruvato en el medio de cultivo invierte o desenmascara diferencias no observadas en la condición con piruvato, siendo una consecuencia del efecto protector del piruvato ya que, cuando se encuentra en el medio de cultivo, las células son capaces de incorporarlo directamente sin tener que metabolizar la glucosa hasta el final. Teniendo en cuenta este dato y los resultados obtenidos anteriormente, se observó que estas diferencias se aprecian mayormente en los cíbridos OA ya que, posiblemente requieren un mayor esfuerzo metabólico a la hora de equilibrar la falta de sustrato y el déficit de energía correspondiente. Así, los cíbridos presentaron una respuesta diferente ante estímulos relacionados con el ambiente articular afectando a parámetros mitocondriales que posteriormente se traducirán en un mal funcionamiento de los procesos llevados a cabo por este orgánulo.

OBJETIVO 3

Respuesta al estrés oxidativo, apoptosis y autofagia en los
cíbridos transmitocondriales.

Objetivo 3

El estrés oxidativo está relacionado con un desequilibrio en la producción de *ROS*. Los *ROS* se generan mayoritariamente a nivel mitocondrial, donde, a pesar de la eficiencia del acoplamiento entre la CTE y la fosforilación oxidativa, algunos electrones escapan de la ruta pudiendo reducir al oxígeno más próximo dando lugar al anión superóxido mitocondrial (O_2^-), uno de los *ROS* más oxidativos (76, 139). En concreto, este compuesto se genera en los complejos I y III de la CTE situados en la membrana interna mitocondrial, pudiendo ser liberado tanto al interior de la matriz como al espacio intermembrana mitocondrial (77, 140-143).

En condiciones normales, la producción de *ROS* en el interior celular forma parte de la necesaria regulación de procesos como la proliferación celular, el metabolismo, la apoptosis, etc. Del mismo modo, se ha descrito que estas moléculas juegan un papel fundamental como mensajeros secundarios intracelulares de funciones normales en la célula como la expresión génica o la activación de cascadas de señalización (119, 140). Cuando se produce un incremento en la generación de *ROS*, estos se eliminan mediante enzimas detoxificadoras como la superóxido dismutasa mitocondrial 2 (*SOD2*). La detoxificación de O_2^- mediante la acción de la enzima *SOD2* da lugar a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que posteriormente es neutralizado a H_2O por la enzima catalasa o la glutatión peroxidasa (76, 139, 144). Cuando los sistemas de detoxificación celular fallan, el O_2^- puede reaccionar directamente con el óxido nítrico (ON) para dar lugar al peroxinitrito o con el H_2O_2 para dar lugar a la formación de radicales hidroxilos (OH^\cdot) (77, 119).

En condiciones de estrés, como un estado inflamatorio o durante el proceso de envejecimiento, se ha descrito un incremento en la producción de *ROS* de manera continuada, lo que produce daños tanto en el genoma mitocondrial como en

Objetivo 3

diversas maquinarias celulares. Este escenario se da en la patología artrósica de tal modo que se sabe que los condrocitos de pacientes artrósicos presentan un mayor número de mitocondrias despolarizadas, menor nivel de producción de ATP, así como unos niveles de producción de ROS más altos y una menor expresión de *SOD2* que los obtenidos de pacientes sanos. El conjunto de todo esto está directamente relacionado con la activación de los procesos de regulación de apoptosis y muerte celular que conllevan a la degradación del tejido y al desarrollo de la enfermedad (76, 80, 100, 145, 146).

La apoptosis celular se considera un mecanismo complejo y necesario en el mantenimiento normal de los tejidos adultos (147). Además, a nivel celular es un mecanismo de respuesta y defensa frente a diferentes estímulos adversos que conlleva una cascada de eventos moleculares dependientes de ATP (148). La relación entre la apoptosis y el estrés oxidativo se ha descrito en el desarrollo de diferentes enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson, donde se produce un desequilibrio en la producción de ATP y en la polarización de la membrana mitocondrial que aumenta la permeabilidad y favorece la activación de la apoptosis (147). La apoptosis es un proceso que se puede dividir en fases. En estadios de apoptosis tempranos, se origina un incremento de la actividad de los factores pro-apoptóticos, dentro de la familia del regulador de apoptosis *B-cell lymphoma 2 (BCL2)* (148). Estos factores favorecen la permeabilización de la membrana mitocondrial que posteriormente da lugar a la liberación del citocromo c. Durante estadios tardíos, el citocromo c, junto a otras proteínas, induce la activación de las caspasas 3, 7 y 9 que provocan la condensación y fragmentación del ADN, la disgregación del citoesqueleto y la formación de cuerpos apoptóticos. Finalmente, la necrosis conlleva una morfología celular disgregada donde las membranas del núcleo y de la célula apenas son reconocibles, los orgánulos se encuentran mayormente descompuestos y el material citoplasmático de la célula se libera a los alrededores (111, 147, 149, 150).

Objetivo 3

Los resultados descritos en la literatura revelan que los condrocitos de donantes OA presentan niveles de apoptosis más elevados que aquellos que provienen de un cartílago sano. Además, se ha descrito que la apoptosis se ve incrementada a medida que aumenta la severidad y el desarrollo de la patología OA (146, 148, 151). Este incremento en la muerte celular característica del proceso artrósico se asocia con una menor celularidad en el cartílago de pacientes con esta patología, poniendo de manifiesto la relación que existe entre ambos parámetros (152, 153).

La autofagia es otro parámetro relacionado con el desarrollo de la OA. Es un mecanismo celular por el cual se seleccionan y marcan moléculas y/o orgánulos disfuncionales que se han ido acumulando con el paso del tiempo y que, finalmente, se degradan mediante lisosomas (154). Son numerosos los estímulos que activan la autofagia a través de la inhibición de la función del *mammalian target of rapamycin (mTOR)*, uno de los principales puntos de regulación de la autofagia, en concreto, estímulos como la inanición, hipoxia, estrés del retículo endoplasmático o un aumento de temperatura se han descrito en la literatura previamente (155). Una vez que se activa el proceso autofágico, comienza la fase de nucleación y elongación, cuya principal característica es la formación de una doble membrana que englobará a los productos de desecho (orgánulos) y parte del citoplasma celular, dando lugar al autofagosoma gracias a la función de la *microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3 (LC3)*. Esta proteína se encuentra o bien en el citoplasma en forma de LC3 I, o bien, en la membrana del autofagosoma en forma de LC3 II, lo que la convierte en un marcador de autofagia en fases más avanzadas, posibilitando la cuantificación de la cantidad de autofagosomas celulares y, por tanto, del flujo de autofagia (156). Por último, la fase de fusión y degradación consiste en la unificación de la membrana del autofagosoma con la de un lisosoma (autolisosoma), donde finalmente se digieren los componentes del interior (155, 156).

Objetivo 3

Cuando las condiciones fisiológicas no son las adecuadas, la autofagia es un proceso que permite que los condrocitos normales eviten los mecanismos de apoptosis y mantengan la viabilidad celular con un bajo requerimiento energético (150, 157). Al igual que el desarrollo de la OA, la autofagia es un mecanismo relacionado con el envejecimiento y en los últimos años se ha establecido una relación directa entre este parámetro y la enfermedad (154). Con la edad, los mecanismos de autofagia se ven reducidos, lo que suprime el efecto citoprotector que presenta en el cartílago y favorece, tanto la muerte celular por apoptosis, como el desarrollo de la patología artrósica (150, 157). Del mismo modo, se ha descrito en estudios previos que un aumento en la producción de ROS se relaciona con un incremento en la eliminación de mitocondrias dañadas mediante este mecanismo (mitofagia) (157, 158). Sin embargo, los principales marcadores de autofagia se encuentran reducidos en condrocitos de pacientes OA por lo que se produce la acumulación de mitocondrias dañadas, originando un desequilibrio en el balance homeostático mitocondrial que conlleva a la muerte celular (154, 156, 159). Así, López de Figueroa y colaboradores describieron que la activación de la autofagia en condrocitos humanos mediante la inhibición de *mTOR* con rapamicina protege a las células frente al incremento del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (160).

Teniendo todo esto en cuenta y del mismo modo que se describió previamente, los híbridos transmitocondriales presentan un modelo celular *in vitro* útil para estudiar y desenmascarar las diferencias a nivel mitocondrial. Para ello, con el desarrollo de este tercer objetivo de esta tesis se estudió el efecto del estrés oxidativo celular mediante el análisis de la producción de anión superóxido, apoptosis y autofagia.

Objetivo 3

1.- Estudio de la respiración mitocondrial mediante el análisis de la tasa de consumo de oxígeno (OCR)

La utilización del *Seahorse Bioscience XFp Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience) permite el estudio de manera simultánea en células vivas de parámetros relacionados con la respiración mitocondrial y con la glucólisis, ya que mide simultáneamente y a tiempo real el consumo de O₂ y el flujo de H⁺ al medio de cultivo. Estas medidas son convertidas en la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y en la tasa de acidificación extracelular (*Extracellular Acidification Rate- ECAR*) que son directamente asociadas con la cuantificación de la respiración mitocondrial y la glicólisis respectivamente.

La determinación de la respiración mitocondrial de los híbridos transmitocondiales se llevó a cabo mediante el estudio y análisis del OCR. Este parámetro fue medido en condición basal y luego tras la inyección de compuestos que inhiben la CTE mitocondrial a través de los puertos de inyección.

1.1 Determinación de la función mitocondrial a través del consumo de oxígeno (OCR)

Un fallo en el correcto funcionamiento de la mitocondria podría suponer un cambio metabólico de gran relevancia a nivel celular. Sin embargo, este orgánulo, cuya principal función es obtener energía para el resto de la célula, presenta uno de los primeros mecanismos de respuesta frente a una variación de las condiciones externas o frente a condiciones de estrés celular. La utilización del kit de *Cell Mito Stress Test* del *Seahorse XFp* nos permitió evaluar el estado de la función mitocondrial.

Objetivo 3

La metodología llevada a cabo en este apartado del objetivo 3, se describió previamente en el Objetivo 1: en el apartado 3.2. Tras sembrar 2×10^4 células por pocillo en una placa de cultivo de 8 pocillos (*cell culture miniplates 8 wells XFp Agilent Seahorse XFp*) en *DMEM 4,5+P* se siguió lo descrito anteriormente. Brevemente, tras incubar la placa en estufa sin CO_2 para eliminar el O_2 , se inició el protocolo para lo cual se inyectó en primer lugar: la Oligo a una concentración de $2 \mu\text{M}$; en segundo lugar, el FCCP a una concentración de $1 \mu\text{M}$ y, por último, la Rot/Ant a una concentración de $2 \mu\text{M}$ y $4 \mu\text{M}$ respectivamente (Figura 4 y Figura 5).

A partir de todo el conjunto de datos obtenidos se calcularon los parámetros correspondientes descritos en la Tabla 3. Del mismo modo que en el apartado anterior, cada una de las condiciones se testaron por triplicado obteniendo un conjunto de 3 medidas por cada experimento representándose como la media \pm DE.

1.2 Determinación de la producción de ATP vía OXPHOS

Con los valores obtenidos tras aplicar la metodología para el estudio del *OCR*, se estimó la producción de ATP en los híbridos a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS).

Para calcular la obtención de ATP vía OXPHOS, se siguió la premisa descrita por Wu y colaboradores, donde la estequiometría entre la tasa de salida de *OCR* y ATP en OXPHOS en estado estacionario es de 5-5,3 (es decir, la oxidación completa de 1 mol de glucosa genera 30-32 moles de ATP), permitiéndonos calcular la obtención de ATP a partir de OXPHOS (161).

2.- Respuesta al estrés oxidativo: técnicas de citometría de flujo

Del mismo modo descrito anteriormente en la metodología de Objetivo 2 en el apartado: 5, la citometría de flujo es una técnica que permite analizar una

Objetivo 3

población homogénea de células diferenciándolas en función de su tamaño y complejidad con los parámetros *FSC* y *SSC*. Asimismo, es una herramienta útil porque ofrece la posibilidad determinar la intensidad de fluorescencia emitida por un compuesto fluorogénico con afinidad por una molécula de interés.

Para el desarrollo del siguiente objetivo, se utilizó un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) analizando 1×10^4 células en cada condición de trabajo por triplicado. Los resultados se analizaron con la herramienta informática *BD CellQuest™ Pro Analysis* y se expresaron como una media \pm DE.

2.1 Estudio del estrés oxidativo en híbridos transmitocondriales

2.1.1 Determinación del estrés oxidativo mediante cuantificación de la producción de anión superóxido mitocondrial (O_2^-)

El estrés oxidativo mitocondrial se analizó mediante la cuantificación de la producción de anión superóxido (O_2^-) mitocondrial. Para ello, se midió la intensidad de fluorescencia emitida por las células al ser incubadas en presencia de *MitoSOX™ Red* (Thermo Fisher Scientific) y detectada en el canal de fluorescencia 2 (FL-2) del citómetro de flujo.

El *MitoSOX™ Red* es un colorante fluorogénico cuya diana es el O_2^- producido por las mitocondrias de las células vivas. Este compuesto es oxidado por el O_2^- y no por otros ROS o especies reactivas de nitrógeno dando lugar a una fluorescencia roja con una excitación/emisión de 510/580 nm permitiendo su detección por citometría de flujo (162).

En primer lugar, para llevar a cabo la cuantificación de O_2^- mitocondrial se sembraron $4,5 \times 10^4$ células por pocillo en placas con 12 pocillos (*MW-12*) en condiciones de *DMEM* 4,5 gr/L de glucosa con y sin piruvato, dejando uno de los pocillos sin marcar como control de la auto fluorescencia celular durante 48 h, tanto en normoxia como en hipoxia. En segundo lugar, con el objetivo de estudiar

Objetivo 3

una condición más estresante, se cuantificó el O_2^- mitocondrial en ausencia de piruvato con *DMEM* 1 gr/L de glucosa en normoxia e hipoxia. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las placas se lavaron con solución salina isotónica (0,9% NaCl) y se incubaron con MitoSOX™ *Red* a una concentración final de 5 μ M en 500 μ l de *Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)* (Thermo Fisher Scientific). Este tampón favorece la asimilación del fluoróforo por parte de las células y al carecer de rojo fenol no interfiere en la intensidad de fluorescencia del compuesto. Tras un tiempo de incubación de 30 min en oscuridad, se recogieron las células por tripsinización y se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm. Por último, se resuspendieron en 400 μ l de solución salina y la suspensión celular se pasó por el citómetro de flujo siguiendo las directrices anteriormente descritas (Objetivo 2 en el apartado: 5).

2.1.2 Respuesta al estrés oxidativo tras incubación con peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es uno de los estímulos de inducción de estrés oxidativo más utilizado en la literatura (103, 134). Este compuesto nos permite evaluar la respuesta celular analizando su viabilidad tras la adición del H_2O_2 al medio de cultivo.

La viabilidad celular se determinó mediante el uso de SYTOX® *Green Dead Cell Stain* (Thermo Fisher Scientific). Este fluoróforo permite el marcaje de las células muertas. El SYTOX® *Green* se une directamente al ADN de estas células aumentando la señal de fluorescencia y posibilitando la distinción entre células muertas y vivas mediante citometría de flujo. Su excitación se produce a 488 nm y tiene un perfil de emisión similar al de células marcadas con fluoresceína (FITC), por lo que la fluorescencia emitida se detectó en canal FL-1 del citómetro de flujo (Figura 24).

Objetivo 3

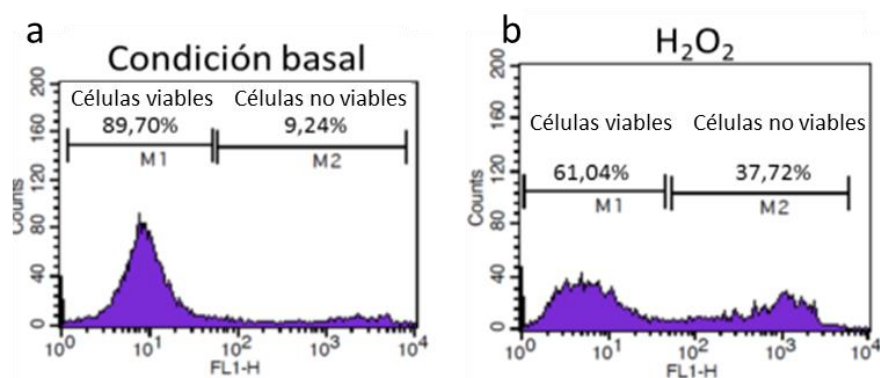


Figura 24 Respuesta al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 . Representación de un histograma de la viabilidad celular obtenida tras marcar las células con SYTOX® Green. (a) Condición basal. (b) Condición de estrés oxidativo generada a partir de la incubación con H_2O_2 a 300 μ M.

Para testar la viabilidad celular frente al estrés oxidativo, se sembraron 8×10^4 células por pocillo en una MW-6. Tras 48 h, se estimularon los pocillos con H_2O_2 a 300 μ M durante 30 min. Transcurrido este tiempo se añadió el SYTOX® Green a 30 nM y se incubaron las células a TA durante 20 min. Una vez terminado el periodo de incubación se levantaron las células y se pasaron por el citómetro de flujo como se describió anteriormente en el apartado 1: técnica de citometría de flujo.

2.1.3 Respuesta frente a un estímulo inductor de estrés oxidativo: la menadiona

La menadiona es un compuesto que pertenece a la familia de la vitamina K. Se ha descrito que estas sustancias presentan la capacidad de inhibir la fosfatasa y la actividad de la ADN polimerasa γ mitocondrial (163). Por ello, resultó de interés evaluar si este compuesto se comporta como un control positivo de la técnica incrementando la producción de O_2^- y la apoptosis mediada por ROS.

2.1.3.1 Determinación de los niveles de producción de O_2^-

Para determinar si la producción de O_2^- mitocondrial se vio modulada en presencia de menadiona, las células se incubaron con menadiona (Sigma-Aldrich) durante 1 h.

Objetivo 3

Se sembraron 9×10^4 células en *DMEM* 4,5+P en *MW-6* incubándolas durante 48 h a 37°C , 5% de CO_2 y humedad a saturación. Posteriormente, las células se incubaron con *DMEM* 4,5+P suplementado al 0,5% SBF con menadiona a $50 \mu\text{M}$ durante 1 h. Este proceso de depleción del SBF del 10% al 0,5% se realiza de manera rutinaria en determinadas incubaciones con compuestos en los que el alto porcentaje de suero puede intervenir en la incorporación del compuesto a la célula. Por último, se continuó con el protocolo de detección de O_2^- mitocondrial mediante el marcaje con MitoSOX™ *Red* y cuantificación por citometría de flujo cuya metodología se describió al inicio de este apartado.

2.1.3.2 Análisis de la muerte celular programada

La muerte celular programada, también conocida como apoptosis, es un proceso de muerte celular que se da en las células de un tejido con el objetivo de mantener la homeostasis del mismo. Teniendo en cuenta que la menadiona podría actuar como un inductor de *ROS* mitocondriales y, que el estrés oxidativo incrementa la muerte celular, se analizó el efecto de este compuesto en la apoptosis celular mediante citometría de flujo.

La apoptosis celular se midió utilizando el kit *Apoptosis Detection* (ImmunoStep). Para ello, se sembraron $4,5 \times 10^4$ células por pocillo en *MW-12* durante 48 h en *DMEM* 4,5 ±P con 10% de SBF, disminuyendo la concentración del SBF al 0,5% 24 h antes de llevar a cabo la incubación con el estímulo. Posteriormente, las células se incubaron con menadiona a $50 \mu\text{M}$ durante 2 h con el objetivo de lograr un efecto mayor que en el caso del estudio de producción de *ROS* mitocondriales. Tras la incubación, las células se pasaron a tubos, se lavaron para eliminar los restos de medio y se resuspendieron en $100 \mu\text{l}$ de tampón de anexina al 1X, lo que favorece la unión de la anexina V marcada con FITC a la fosfatidilserina expuesta en la superficie externa de la membrana celular de células en fases tempranas de apoptosis. A continuación, se incubó cada uno de los tubos durante 15 min en

Objetivo 3

oscuridad con 2,5 μ l de anexina V y 2,5 μ l de Yoduro de Propidio (YP) (ImmunoStep). El YP logra el marcaje de aquellas células que han perdido la integridad de la membrana celular y se encuentran en fase apoptótica avanzada, ya que entonces puede unirse directamente al ADN. Una vez terminado el periodo de incubación se pasaron por el citómetro de flujo como se describió anteriormente.

En este caso, los dos compuestos utilizados (anexina V y YP) emiten fluorescencia a una longitud de onda diferente. La anexina V está marcada con ficoeritrina (FITC), fluorescencia verde, y su longitud de onda de emisión es a 518 nm siendo detectado por el canal FL-1 del citómetro (Figura 25). Por su lado, el YP presenta fluorescencia roja por sí solo y su espectro de emisión es a una longitud de onda de 617 nm, detectándose en el canal FL-3 del citómetro. El conjunto de ambos compuestos permite analizar y distinguir el porcentaje de población de células intactas (negativo para anexina V y YP), células en apoptosis temprana (positivo para anexina V y negativo para YP), células en apoptosis tardía (positivo para anexina V y YP) y, por último, de células necróticas (solamente positivo para YP).

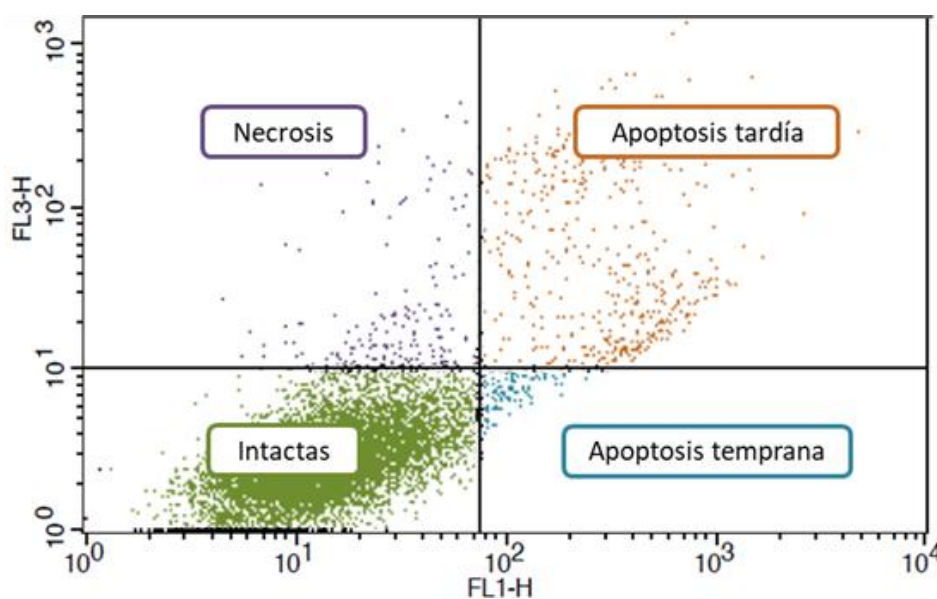


Figura 25 Representación gráfica del patrón obtenido tras marcar las células con Anexina V y yoduro de propidio (YP). Las células intactas (cuadrante inferior izquierdo (verde)); células en apoptosis temprana (cuadrante inferior derecho (azul)); células en apoptosis tardía (cuadrante superior derecho (naranja)); células necróticas (cuadrante superior izquierdo (púrpura)).

Objetivo 3

En todos los experimentos se determinó la apoptosis celular tanto en ausencia de menadiona (control) como en presencia de este estímulo (mena), acompañado de una condición sin fluoróforo que nos permitió centrar la población.

2.2 Estudio de la apoptosis celular en presencia de un estímulo inflamatorio: IL-1 β

A la hora de estudiar la apoptosis se indujo un ambiente inflamatorio cultivando las células en presencia de interleuquina 1 β (IL-1 β) (Sigma-Aldrich). La selección de esta citoquina proinflamatoria radica en su papel en el desarrollo de la OA, ya que provoca una situación de inflamación crónica que favorece la destrucción del cartílago y la muerte celular.

Para ello, se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado anterior solo que en este caso las células se incubaron en presencia de IL-1 β a una concentración de 10 ng/ml durante 24 h.

Para poder evaluar si la IL-1 β induce una variación en el porcentaje de células apoptóticas, se llevó en paralelo un control positivo de la técnica mediante la incubación de las células con estauroesporina a una concentración de 2 μ M durante 2 h.

3.- Niveles de expresión proteica de marcadores de autofagia.

Como se describió anteriormente, la autofagia es un mecanismo celular de degradación de compuestos dañados entre los que se encuentran proteínas, lípidos o incluso orgánulos. Este mecanismo celular se puede estudiar a través del marcaje de proteínas específicas de cada una de sus fases como *ribosomal protein S6 (rpS6)* cuya fosforilación (*p-rpS6*) indica la activación de *mTOR* o *LC3* (150, 164). Los niveles de estas proteínas se analizaron mediante la técnica de *western blot (WB)*.

Objetivo 3

3.1 Extracción y cuantificación de proteínas a partir de un extracto celular mediante BCA

La extracción de proteínas para técnicas de *WB* se llevó cabo utilizando un tampón de lisis (urea a una concentración de 6M y 2% de dodecilsulfato sódico (*SDS*) (Sigma-Aldrich)) que favorece la lisis celular y la liberación de las proteínas al medio extracelular.

Para ello, se sembró un total de 6×10^5 células por pocillo en *MW-6* en *DMEM* 4,5 +P durante 48 h de cultivo. Además, las células se cultivaron durante 16 h en presencia de rapamicina (Calbiochem, Alemania) a una concentración de 10 μM como inhibidor de *mTOR* o con cloroquina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 30 μM como inductor de *LC3*, cuyos valores se utilizaron como control de la técnica. A continuación, se lavaron las células con solución salina isotópica y se añadieron 200 μl de tampón de lisis raspando la superficie de cultivo para favorecer la recogida de las células. Finalmente, las muestras se lisaron durante 5 min y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min a 4°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se almacenaron a -20°C.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante un ensayo colorimétrico basado en ácido bicicoínico (*BCA*) con el kit comercial *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific) permitiéndonos la cuantificación proteica en presencia de detergentes. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se analizó la concentración de cada muestra en base a una curva patrón. Brevemente, en una placa de 96 pocillos se añadieron diferentes concentraciones (0 hasta 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de albumina sérica bovina (*BSA*) a partir de un *Stock* de 2 mg/ml (curva patrón) y 2 μl de cada muestra por duplicado. A continuación, se añadieron 200 μl de la mezcla necesaria para llevar a cabo la reacción colorimétrica a una proporción 50:1 de *BCA Reagent A* con *BCA Reagent B* y se incubó durante 30 min a 37°C en oscuridad. Finalmente se midió a través de espectrofotometría a una $\lambda=570$ nm con el *NanoQuant Infinite*

Objetivo 3

M200 (Tecan). A partir de los valores de abs obtenidos de la curva patrón, se calculó la ecuación y se interpolaron los valores de concentración de cada extracto.

3.2 Técnica de *western blot* (WB): electroforesis, transferencia y marcaje de proteínas de interés

En primer lugar, para llevar a cabo el análisis de la expresión proteica en las muestras mediante WB, se necesitó separar el conjunto de proteínas de cada muestra para, posteriormente, marcarlas y revelar los resultados.

La separación de proteínas de cada una de las muestras se realizó mediante electroforesis unidimensional en gel comercial de poliacrilamida 4-20% (Bio-Rad, Hercules). Para ello, se ajustaron todas las muestras a una concentración final de 20 µg, se mezclaron con tampón de carga (4X *Laemmli Sample buffer solution* (Bio-Rad, Hercules)) y β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), para favorecer la solubilidad de las proteínas a un volumen final de 50 µl y se incubaron durante 5 min a 95°C para romper la estructura tridimensional de las proteínas y facilitar el marcaje posteriormente. A continuación, las muestras y el marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards* (BioRad) se cargaron en el gel y se corrieron en presencia de tampón de electroforesis 1X (0,25 M Tris-Base, 1,92 M glicina, 1% SDS y H₂O hasta 1L) a 80 voltios durante 20 min y después 120 voltios a 60 min.

Una vez que el perfil proteico de cada muestra se separó mediante electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas por campo eléctrico a una membrana de polivinildeno de difluorido (*Immuno-Blot®PVDF Membranes for protein Blotting*, Bio-Rad), cuya principal característica es que permite el marcaje de las proteínas. Previamente, la membrana se activó en presencia de metanol y se humedeció en tampón de transferencia 1X (0,25 M Tris-Base, 1,92 M glicina, 20% metanol y H₂O hasta 1 L). Para la transferencia de las proteínas se utilizó un sistema sándwich con

Objetivo 3

Mini Trans-Blot (Bio-Rad) (papel de filtro, el gel y la membrana) y, en presencia de tampón de transferencia, se transfirió a 0,20 amperios durante 1 h y 20 min. A continuación, se bloquearon los sitios inespecíficos con 5% de leche en polvo con tampón salino Tris-Tween (TBST) a 4°C durante 1 h en movimiento y se incubó durante toda la noche con los anticuerpos primarios (Tabla 12). Tras cada uno de ellos, la membrana se lavó 3 veces durante 5 min con tampón de lavado (25 mM Tris-Base, 0,15 M Cloruro Sódico (NaCl), 0,05% Tween 20 y H₂O hasta 1L; pH 7,4) en agitación. A continuación, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora a TA (Tabla 12). Finalmente, se lavó 3 veces y se revelaron las proteínas mediante un kit de revelado de quimioluminiscencia (Sigma-Aldrich) basado en un método enzimático. Este método consiste en el marcaje del anticuerpo secundario con *horseradish peroxidase* (HRP) que cataliza una reacción cuyo producto genera luz permitiendo su lectura a una $\lambda=428$ nm. Las imágenes se obtuvieron con el equipo *Amershan™ Imagen 600* (GE Healthcare). El análisis de las bandas se realizó a través del software *Amershan™ Imagen 600 analysis*. En el caso de *p-rpS6* (activación de *mTOR*), los resultados obtenidos se relativizaron a la expresión proteica de α -tubulina.

Tabla 12 Lista de anticuerpos empleados en la técnica de WB.

		ORIGEN	PM (kDA)	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
AC 1 ^o	LC3	Conejo	14-16	1:1000	Cell Signaling
	<i>p-rpS6</i>	Conejo	32	1:2000	Cell Signaling
	α -tubulina	Ratón	52	1:5000	Sigma-Aldrich
AC 2 ^o	anti-conejo*	Burro	-	1:1000	GE Healthcare
	anti-ratón*	Cabra	-	1:10000	GE Healthcare

AC: anticuerpo. PM: peso molecular. kDA: kilodaltons. * HRP-conjugado IgG.

Objetivo 3

4.- Expresión génica de enzimas implicadas en el metabolismo celular

Del mismo modo que se describió en la metodología del Objetivo 2 en el apartado 7, el análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante *RT-PCR* en *LightCycler*® 480 II utilizando sondas *Taqman*® *UPL Probe*.

4.1 Niveles de expresión génica del inductor de hipoxia celular: *HIF1α*

A la hora de estudiar el estrés oxidativo bajo diferentes condiciones de cultivo se analizó la producción de O_2^- cultivando las células en un bajo porcentaje de O_2 . En base a estos parámetros estudiados, se analizó la expresión génica de *hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit (HIF1α)*, cuya principal función es la respuesta a condiciones de hipoxia en las células. Esto es debido a que, en presencia de oxígeno, *HIF1α* es hidroxilado y degradado vía proteosoma, sin embargo, en ausencia de oxígeno, los niveles de esta proteína se estabilizan y dan paso a la activación de genes diana de enzimas implicadas en la respuesta a condiciones de hipoxia, como a genes que promueven la proliferación celular y la angiogénesis (165, 166).

Para analizar la expresión de este gen, se sembraron 6×10^4 células en placa MW-6, se incubaron durante 48 h en *DMEM* 4,5+P tanto en normoxia como en hipoxia, se obtuvo el ARN, se retrotranscribió a ADNc y se realizó la *RT-PCR* mediante el empleo de los cebadores descritos en la Tabla 9 para el gen de *HIF1α*.

4.2 Respuesta al estrés oxidativo en los niveles de expresión génica de las enzimas: *NFE2L2* y *SOD2*

La respuesta al estrés oxidativo inducido mediante la incubación con menadiona también se evaluó a través del análisis de la expresión génica de enzimas implicadas en los sistemas de detoxificación celular. Entre ellas destacan el *nuclear*

Objetivo 3

factor erythroid-derived 2-Like 2 (NFE2L2) y *SOD2*. *NFE2L2* está implicada en procesos de replicación del ADNmt en respuesta al estrés celular como procesos de inflamación o estrés oxidativo (119, 133) y, *SOD2*, como se mencionó anteriormente, en detoxificación celular (76, 139). Teniendo en cuenta la función de ambos genes, el incremento en los niveles de producción de ROS podría jugar un papel fundamental en la inducción de su expresión génica, actuando como un mecanismo de control a la hora de intentar paliar los efectos perjudiciales de los ROS (119, 167).

Para llevar a cabo el análisis de la expresión génica se sembraron 6×10^4 células en placa MW-6 y se incubaron durante 48 h en DMEM 4,5+P, disminuyendo la concentración de SBF hasta el 0,5% durante las últimas 24 h. A continuación, las células se incubaron con menadiona a una concentración de 50 μ M durante 1 h. Tras finalizar la incubación, se obtuvo el ARN y se retrotranscribió del mismo modo descrito en la metodología del Objetivo 2 en el apartado: 6. Por último, se realizó la RT-PCR utilizando los cebadores descritos en la Tabla 9 para los genes de *NFE2L2* y *SOD2*.

4.3 Niveles de expresión génica de marcadores de autofagia: *Beclin 1* y *BCL2*

Con el objetivo de completar el estudio de autofagia realizado por WB, se analizaron los niveles de expresión génica de otro marcador específico de este mecanismo y de uno de sus factores de regulación. El estudio de la proteína beclin 1 (*BECN1*) permitió conocer los niveles de activación de la autofagia debido a que esta proteína, junto con otras, forman un complejo proteico de nucleación (1ª fase de la autofagia), que da lugar a los primeros estadios de formación de la doble membrana del autofagosoma (168). Por su parte, el factor de regulación de apoptosis (*BCL2*) es una proteína implicada en multitud de procesos celulares, pero resalta su principal función en la muerte celular (150). Esta proteína se encuentra implicada tanto en procesos de apoptosis como de autofagia, y en este

Objetivo 3

último caso, regula la actividad de *BECN1* mediante la formación de un complejo proteico entre ambos (*BCL2/BECN1*) que inhibe el inicio del proceso autofágico (149, 157).

Del mismo modo descrito en el apartado anterior, se sembraron 6×10^4 células en placa *MW-6*, se incubaron durante 48 h en *DMEM* 4,5+P, se obtuvo el ADNc mediante la retrotranscripción del ARN y se realizó la *RT-PCR* mediante el empleo de los cebadores descritos en la Tabla 9 para los genes *BECN1* y *BCL2*.

5.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos en este objetivo se representaron como la media \pm DE de 3 experimentos independientes. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete informático *GraphPad Prism* version 6.01 (GraphPad). Para evaluar las diferencias entre los grupos se siguió la metodología recogida en la Tabla 10. En caso de que se emplee otro tipo de análisis estadístico, la metodología utilizada se detallará en cada uno de los apartados correspondientes. Los valores analizados con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Objetivo 3

1.- Análisis de estatus mitocondrial

1.1 Determinación de la tasa de consumo de oxígeno (OCR)

El análisis del estatus mitocondrial se llevó a cabo mediante la medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) estudiando los parámetros que aparecen reflejados en la Figura 26.

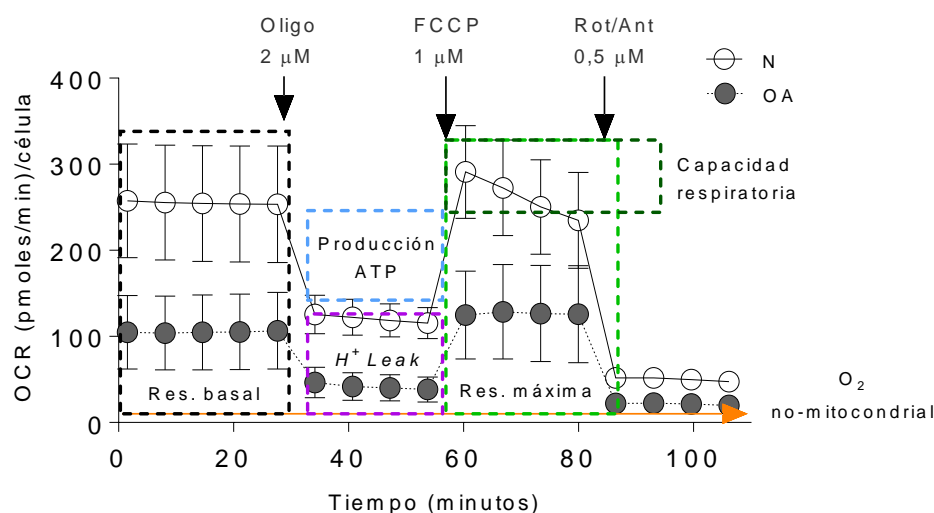


Figura 26 Representación de la modulación de la OCR tras la adición de los inhibidores correspondientes. OCR: tasa de consumo de oxígeno. Oligo: oligomicina. Rot/Ant: rotenona/antimicina. Res: respiración. H⁺: protón.

Tras el análisis de los datos se observó que los cíbridos OA presentan disminuidos todos los parámetros analizados excepto la capacidad respiratoria, que se vio aumentada en comparación con los N, lo que refleja un estatus mitocondrial deficiente (**respiración basal OA** $92,07 \pm 39,98$ vs N $155,50 \pm 54,08$ $p \leq 0,001$; **respiración máxima OA** $114,70 \pm 50,01$ vs N $160,60 \pm 44,76$ $p \leq 0,01$; **H⁺ Leak OA** $25,38 \pm 13,23$ vs N $54,48 \pm 13,39$ $p \leq 0,0001$; **ATP asociado a OCR OA** $66,69 \pm 28,69$ vs N $101,00 \pm 42,04$ $p \leq 0,01$; **capacidad respiratoria OA** $124,20 \pm 6,71$ vs N $107,00 \pm 16,21$ $p \leq 0,001$) (Figura 27).

Objetivo 3

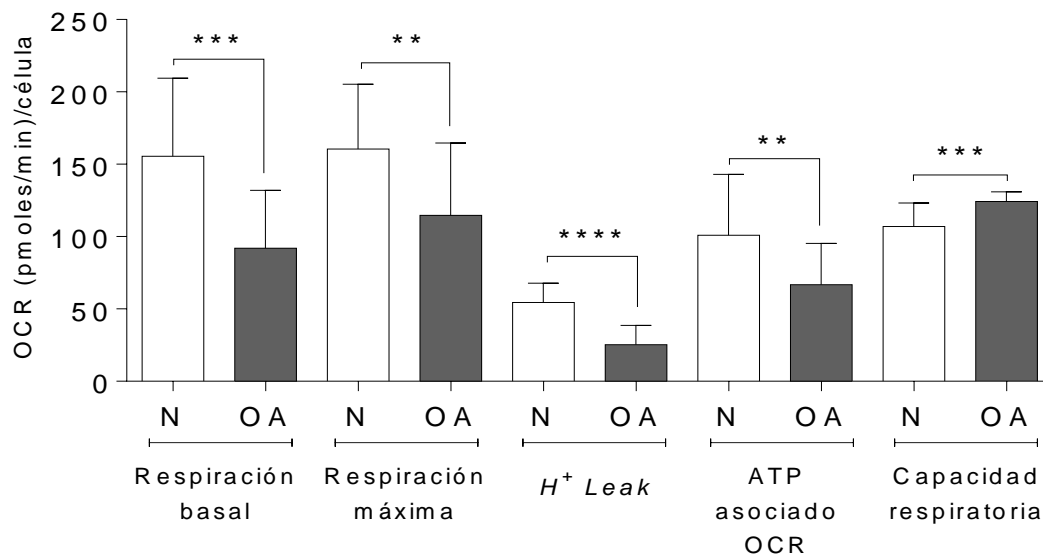


Figura 27 Determinación del estatus mitocondrial de los híbridos N y OA. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ híbridos N y OA. OCR: tasa de consumo de oxígeno.

Por su parte, a la hora de realizar el análisis de los datos en función de los haplogrupos de ADNmt se observó que dentro de los híbridos N, aquellos portadores del haplogrupo J (N-J) presentan valores disminuidos de todos los parámetros analizados excepto de la capacidad respiratoria en comparación con los N-H (Tabla 13). Sin embargo, a la hora de analizar los datos de los híbridos OA, esta relación se invierte, siendo los híbridos OA-J los que presentan todos los parámetros estudiados aumentados frente a los OA-H a excepción de la capacidad respiratoria (Tabla 13). Cabe destacar que, al realizar el análisis en función de los haplogrupos, pero entre híbridos N y OA, se vio que los híbridos OA-H presentan todos los parámetros analizados disminuidos en comparación con los N-H a excepción de la capacidad respiratoria, que fue mayor (Tabla 13).

Objetivo 3

Tabla 13 Datos obtenidos del estudio de los parámetros de función mitocondrial estudiados y análisis en función de los haplogrupos de ADNmt.

	<i>N-H</i>	<i>N-J</i>	<i>OA-H</i>	<i>OA-J</i>
<i>Respiración basal</i>	196,30±31,94	109,50±31 ^{####}	63,79±9,87 ^{****}	120,40±38,72 ^{###}
<i>Respiración máxima</i>	184,20±35,98	133,90±39,64 [#]	77,16±12,12 ^{****}	152,20±44,75 ^{##}
<i>ATP asociado OCR</i>	134,30±23,20	63,57±19,98 ^{####}	44,95±6,91 ^{****}	88,43±25,24 ^{####; *}
<i>H⁺ Leak</i>	62,05±10,18	45,96±11,60 ^{##}	18,84±6,43 ^{****}	31,92±15,31 [#]
<i>Capacidad máxima</i>	93,77±8,91	121,90±5,55 ^{####}	120,90±3,16 ^{****}	127,50±7,81

Valores presentados como media ± DE ((pmoles/min) /célula). OCR: tasa de consumo de oxígeno. #p≤0,05, ##p≤0,01, ###p≤0,001, ####p≤0,0001 haplogrupos de ADNmt H y J. *p≤0,05, ****p≤0,0001 híbridos N y OA.

Todos estos resultados muestran que los híbridos generados con plaquetas de donantes OA portadores del haplogrupo de ADNmt H reflejan disminuida su capacidad mitocondrial, manifestando una deficiente función mitocondrial en comparación con aquellos portadores del haplogrupo de ADNmt J.

1.2 Determinación de la producción de ATP

La determinación del ATP asociado a OXPHOS se realizó en base a la relación estequiométrica en estado estacionario de 5-5,3 entre el OCR y el ATP.

Los resultados obtenidos mostraron que la producción de ATP debida al OXPHOS fue menor en los híbridos OA frente a los N (OA 333,50±143,40 vs N 505,00±210,20 p≤0,05) (Figura 28 a). A la hora de realizar el análisis de los datos, pero en este caso en función de los haplogrupos de ADNmt, se observó que los híbridos N-J presentan menor producción de ATP asociado a OXPHOS que los N-H, relación que se vio invertida al analizar los híbridos OA, donde los OA-J presentaron niveles más altos de producción de ATP asociado a OXPHOS en comparación con

Objetivo 3

los OA-H (N-J $317,80 \pm 99,92$ vs N-H $671,40 \pm 116,00$ $p \leq 0,001$; OA-J $442,20 \pm 126,20$ vs OA-H $224,80 \pm 34,59$ $p \leq 0,001$) (Figura 28 b).

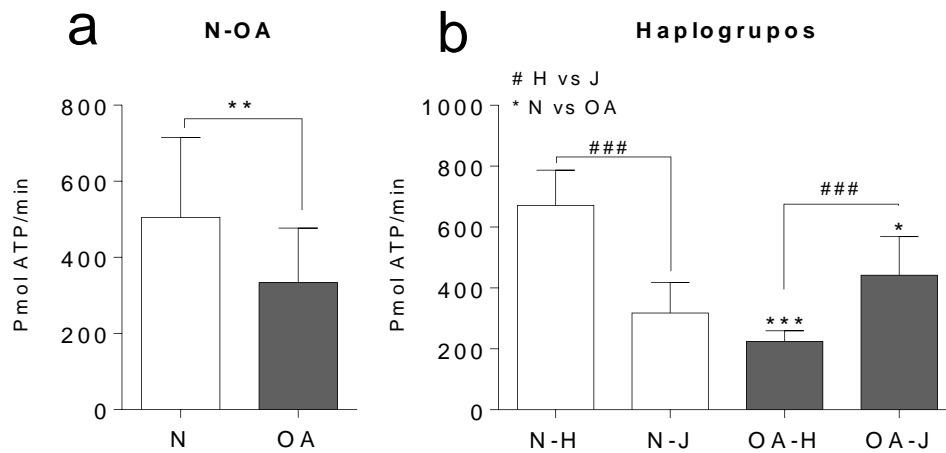


Figura 28 Determinación del ATP asociado a la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Cíbridos N y OA (a) y haplogrupos de ADNmt H y J (b). Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, cíbridos N y OA. ### $p \leq 0,001$ haplogrupos de ADNmt H y J. Pmol: pico mol. Min: minutos.

2.- Análisis del estrés oxidativo

2.1 Cuantificación de la producción de Anión Superóxido mitocondrial (O_2^-)

Tras 48 h de cultivo, se analizaron los niveles de producción de O_2^- mediante marcaje con MitoSOXTM Red, debido a que es la principal especie reactiva de oxígeno producida por los complejos I y III de la CTE mitocondrial.

2.1.1 Niveles de producción de O_2^- en células cultivadas en presencia 4,5 gr/L de glucosa

El análisis de los niveles de producción de O_2^- entre cíbridos N y OA se llevó a cabo cultivando las células en presencia y ausencia de piruvato, así como en condiciones de normoxia e hipoxia. En todas las condiciones testadas los cíbridos OA mostraron una producción de O_2^- significativamente más elevada que los N. Al evaluar el efecto del piruvato sobre la producción de O_2^- , los datos reflejaron que la presencia de este sustrato mitocondrial protege frente a la producción de O_2^- .

Objetivo 3

Esto es debido a que las células cultivadas en ausencia del mismo, mostraron niveles significativamente más altos de O_2^- independientemente del porcentaje de oxígeno en el que se crecieron (Tabla 14) (Figura 29 a y b).

Tabla 14 Resultados obtenidos de la producción de O_2^- en presencia de 4,5 gr/L de glucosa en cada condición de cultivo para cada uno de los grupos de estudio.

	NORMOXIA		HIPOXIA	
	N	OA	N	OA
DMEM 4,5 +P	17,79±7,31	36,61±16,75	25,91±18,41	47,89±11,74
DMEM 4,5 -P	56,79±53,97	172,5±87,44	64,77±41,89	153,4±59,91
	NORMOXIA			
	N-H	N-J	OA-H	OA-J
DMEM 4,5 +P	19,60±8,50	31,86±28,01	38,63±18,16	34,59±17,06
DMEM 4,5 -P	29,14±16,78	112,10±63,78	186,8±69,62	158,20±108,80
	HIPOXIA			
	N-H	N-J	OA-H	OA-J
DMEM 4,5 +P	28,76±22,54	20,20±3,43	53,85±6,29	41,93±14,08
DMEM 4,5 -P	79,36±43,99	35,58±16,28	201,30±32,72	105,40±31,76

Valores presentados como media de la intensidad de fluorescencia ± DE. P: piruvato.

El análisis comparativo de los híbridos en base al haplogrupo de ADNmt reflejó que, al crecer las células en presencia de piruvato tanto en normoxia como en hipoxia, los niveles de O_2^- apenas se vieron modulados, reflejando únicamente un incremento significativo entre N-H y OA-H en normoxia. Sin embargo, cuando el piruvato se retiró del medio de cultivo, los valores de producción de O_2^- se vieron significativamente incrementados y se puso de manifiesto las diferencias existentes entre los haplogrupos de ADNmt tal y como se detalla en la Tabla 14 (Figura 29 c-d).

Objetivo 3

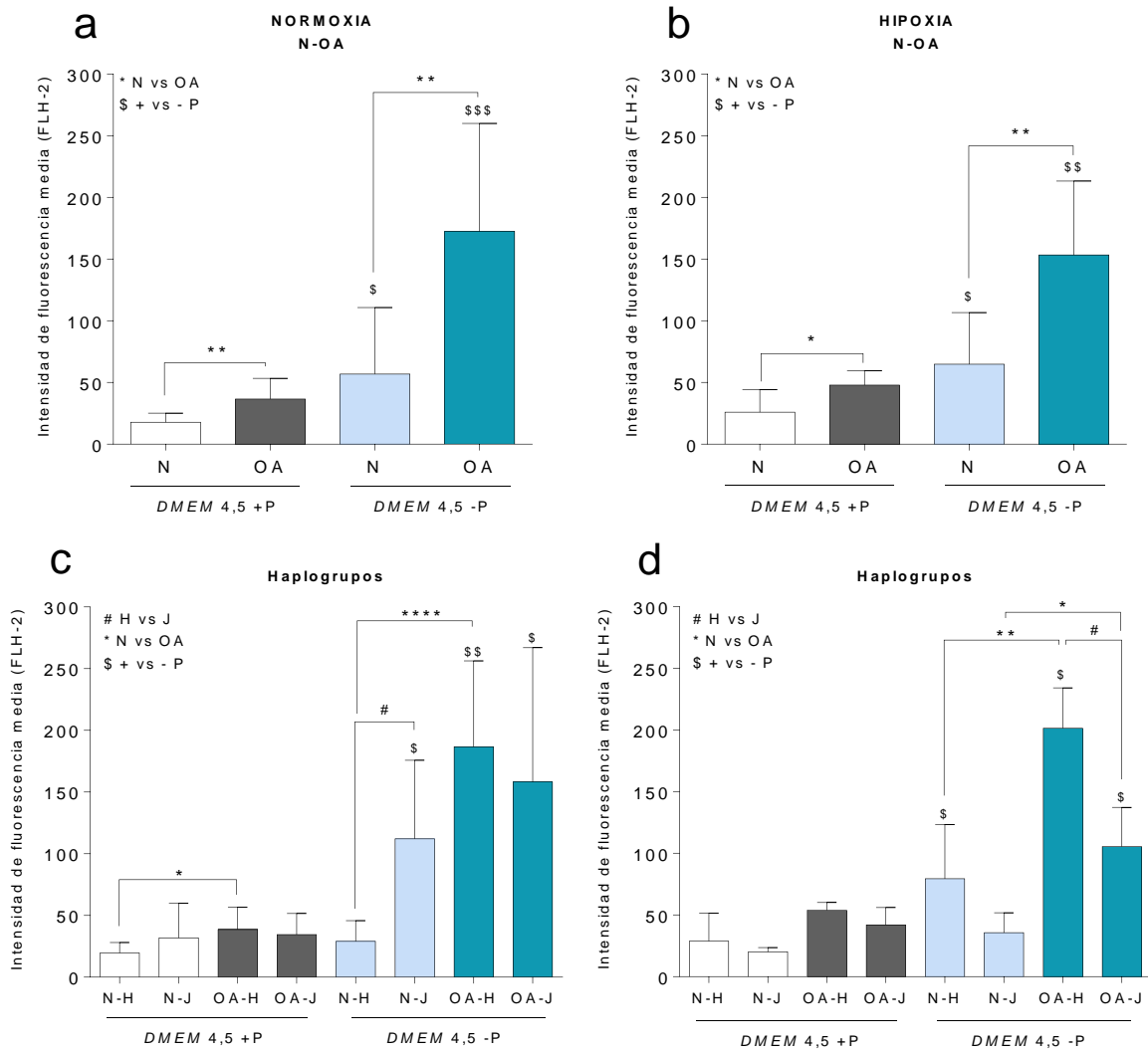


Figura 29 Producción de anión superóxido mitocondrial (O_2^-) en 4,5 gr/L de glucosa en normoxia e hipoxia. **(a-b)** Análisis entre cíbridos normales (N) y artrósicos (OA). **(c-d)** Análisis entre haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$ cíbridos N y OA. \$ $p \leq 0,05$, \$\$ $p \leq 0,01$, \$\$\$ $p \leq 0,001$ + y -P (piruvato). # $p \leq 0,05$ haplogrupos de ADNmt H y J. DMEM +P: blanco (N) y gris (OA). DMEM -P: azul claro (N) y oscuro (OA).

2.1.2 Niveles de producción de O_2^- en células cultivadas en presencia de 1 gr/L de glucosa

Con el objetivo de analizar un escenario con mayor estrés fisiológico y, teniendo en cuenta los resultados anteriores, donde se observó el efecto protector del piruvato en la generación de O_2^- mitocondrial, se analizó este parámetro creciendo las células con una menor concentración de glucosa (DMEM 1 gr/L) y en ausencia de piruvato tanto en normoxia como en hipoxia (DMEM 1 -P).

Objetivo 3

Los datos obtenidos mostraron que los niveles de O_2^- fueron significativamente mayores en cíbridos OA en comparación con los cíbridos N en las dos condiciones testadas (Tabla 15) (Figura 30 a).

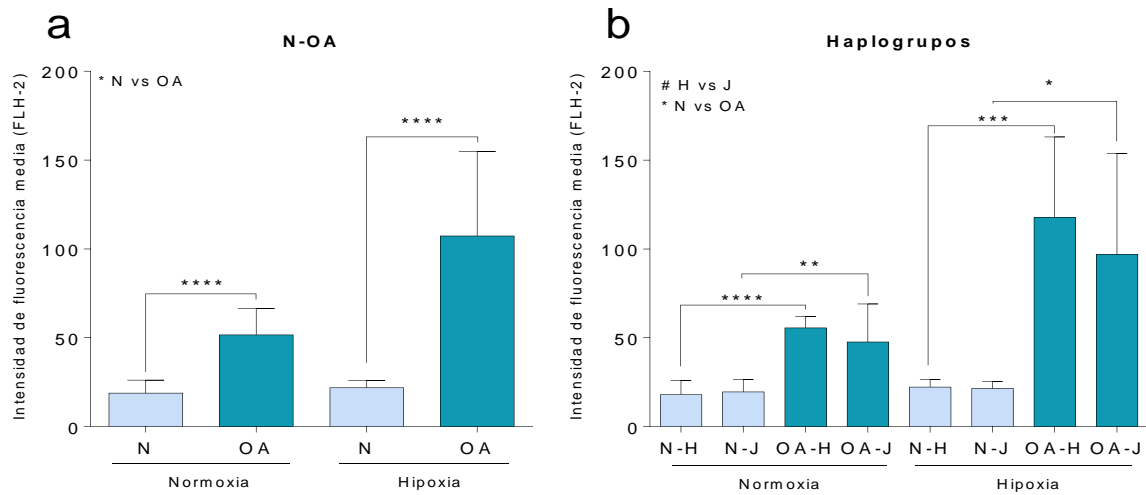


Figura 30 Producción de O_2^- en 1 gr/L de glucosa sin piruvato en normoxia e hipoxia. **(a)** Análisis entre cíbridos normales (N) y artrósicos (OA). **(b)** Análisis entre haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como la media \pm DE de al menos tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$ cíbridos N y OA. # los haplogrupos de ADNmt H y J. DMEM - P: azul claro (N) y oscuro (OA).

Tabla 15 Resultados obtenidos de la producción de O_2^- en presencia de 1 gr/L de glucosa en cada condición de cultivo para cada uno de los grupos de estudio.

	NORMOXIA		HIPOXIA	
	N	OA	N	OA
DMEM 1 -P	18,71 \pm 7,36	51,55 \pm 14,80	21,83 \pm 3,91	107,3 \pm 47
	N-H	N-J	OA-H	OA-J
NORMOXIA	17,95 \pm 7,96	19,47 \pm 7,17	55,50 \pm 6,45	47,61 \pm 21,43
HIPOXIA	22,22 \pm 4,19	21,38 \pm 3,88	117,7 \pm 45,43	96,91 \pm 57

Valores presentados como media de la intensidad de fluorescencia \pm DE. P: piruvato.

Tras separar y analizar los cíbridos en función del haplogrupo de ADNmt (N-H, N-J, OA-H, OA-J), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos haplogrupos de ADNmt (Figura 30 b). En contraste, el análisis comparativo entre N-H y OA-H o N-J y OA-J mostró la misma tendencia descrita anteriormente al realizar el análisis entre cíbridos N y OA. De esta manera, los

Objetivo 3

datos mostraron un incremento de ROS significativo en los cíbridos OA-H y OA-J en comparación con los N-H y N-J, respectivamente (Tabla 15) (Figura 30 b).

2.1.3 Efecto del medio de cultivo en los niveles de producción de O₂⁻

Con el objetivo de comprobar si la concentración de glucosa influye o no en la generación de O₂⁻, se realizó un análisis de los datos al crecer las células en ambos medios de cultivo en ausencia de piruvato tanto en normoxia como en hipoxia. Los datos obtenidos mostraron que los cíbridos N y OA tuvieron valores de producción de O₂⁻ significativamente menores al ser crecidos en una menor concentración de glucosa (DMEM 1gr/L) en ambas condiciones (normoxia e hipoxia) (Tabla 16) (Figura 31).

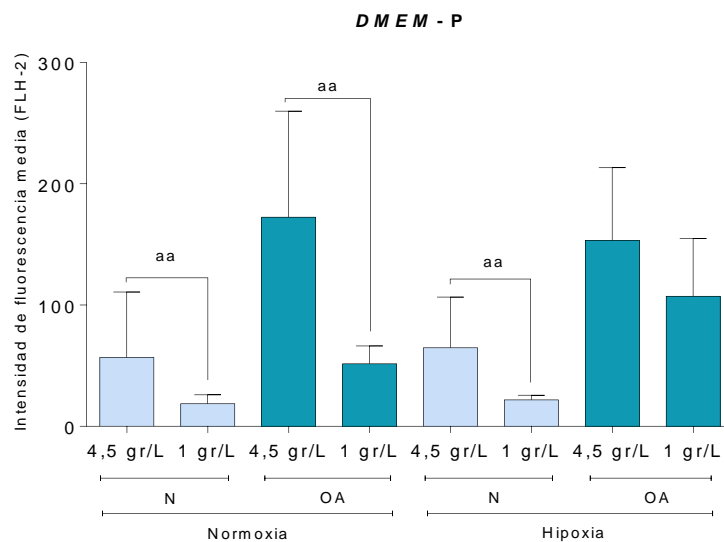


Figura 31 Efecto de la concentración de glucosa en el estrés oxidativo. Los datos se representan como media ± DE analizados mediante *t test* entre la condición de cultivo con DMEM 4,5 gr/L y DMEM 1 gr/L (aa p<0,01). DMEM -P: azul claro (N) y oscuro (OA).

Tabla 16 Resultados obtenidos de la producción de O₂⁻ en el análisis de datos en presencia de 4,5 y 1 gr/L de glucosa en cada condición de cultivo para cada uno de los grupos de estudio.

	NORMOXIA		HIPOXIA	
	DMEM 4,5 -P	DMEM 1 -P	DMEM 4,5 -P	DMEM 1 -P
N	56,79±53,97	18,71±7,36	64,77±41,89	21,83±3,91
OA	172,5±87,44	51,55±14,80	153,4±59,91	107,3±47,48

Valores presentados como media de la intensidad de fluorescencia ± DE. P: piruvato.

Objetivo 3

2.2 Niveles de la expresión génica de *HIF1α*

Para conocer si el crecer las células bajo un porcentaje de oxígeno disminuido indujo un aumento de la expresión de factores implicados en la respuesta a hipoxia, se analizó la expresión génica de *HIF1α*.

El análisis realizado entre los grupos de cíbridos N y OA reflejó que estos últimos presentan niveles de expresión de *HIF1α* disminuidos en comparación con los cíbridos N en ambas condiciones de cultivo (normoxia e hipoxia) (**normoxia OA 0,73±0,29 vs N 1,51±0,28, p≤0,0001; hipoxia OA 0,88±0,36 vs N 1,32±0,40 p≤0,05**). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de este gen al crecer las células con bajo porcentaje de oxígeno en comparación con los datos obtenidos en normoxia (Figura 32 a).

Por su parte, el análisis de la expresión génica de *HIF1α* realizado en base a los haplogrupos de ADNmt H y J no reflejó ninguna modulación de su expresión en función de estos grupos a estudio (N-H, N-J, OA-H y OA-J) (Figura 32 b).

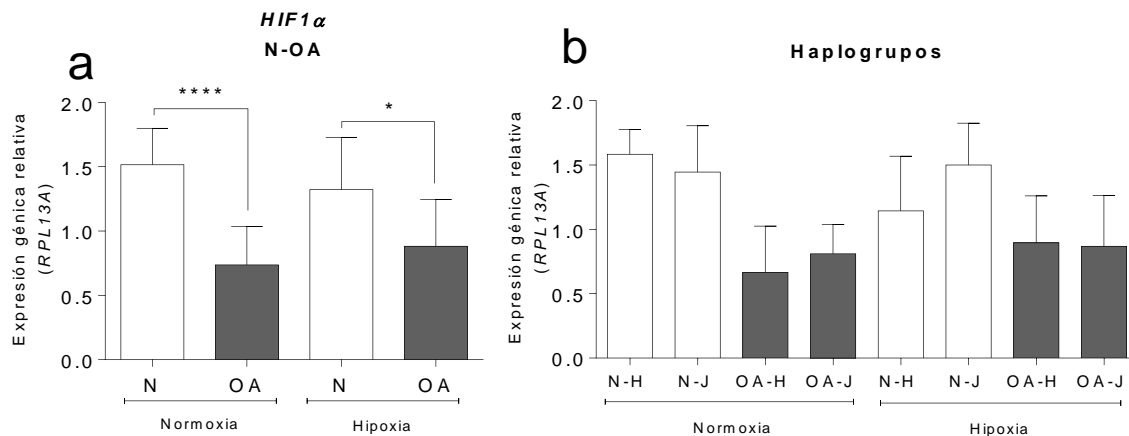


Figura 32 Niveles de la expresión génica relativa de *HIF1α* en cíbridos crecidos en normoxia e hipoxia. **(a)** Análisis entre cíbridos N y OA. **(b)** Análisis entre haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como la media ± DE de al menos tres experimentos independientes. * ≤0,05, **** p≤0,0001 cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J.

Objetivo 3

2.3 Respuesta del estrés oxidativo al peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La determinación de la respuesta al estrés oxidativo tras la incubación de los cíbridos con H₂O₂ a 300 μM se llevó a cabo mediante el uso del fluoróforo SYTOX® *Green*, que permite distinguir las células muertas de las vivas. La principal característica de este compuesto es que se une directamente al ADN del núcleo en aquellas células que están muertas, logrando diferenciarlas de las que están vivas, lo que nos permitió estudiar la respuesta celular frente al estrés oxidativo.

El análisis reflejó que, bajo condiciones de estrés oxidativo, los cíbridos obtenidos a partir de las plaquetas de donantes N muestran una respuesta significativamente mejor que los OA, observándose una menor población de células positivas para SYTOX® *Green* (células muertas) (N 27,15±11,86 vs OA 40,14±12,07 p≤0,05) (Figura 33 a). Estos datos reflejaron que, frente a un incremento de ROS en el medio, los cíbridos N presentan una mejor respuesta.

Para evaluar si los haplogrupos de ADNmt (H y J) juegan un papel diferente en respuesta al estrés oxidativo, se analizó el porcentaje de células positivas para SYTOX® *Green* entre los 4 grupos (N-H, N-J, OA-H, OA-J). Los datos mostraron que los haplogrupos de ADNmt no modularon la respuesta al H₂O₂ (Figura 33 b).

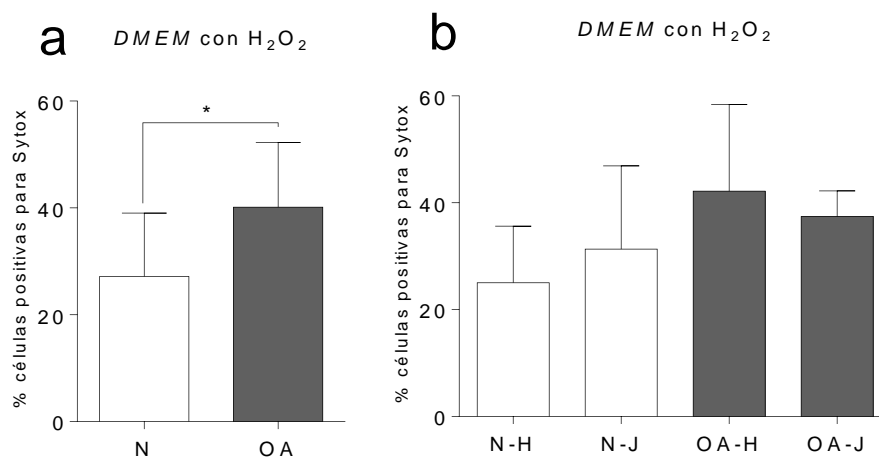


Figura 33 Viabilidad celular representada como porcentaje de células positivas para SYTOX® *Green* tras haber sido incubadas en H₂O₂ a 300 μM. **(a)** Análisis entre cíbridos N y OA. **(b)** Análisis entre haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como media ± DE de al menos tres experimentos independientes. * p≤0,05 cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J.

Objetivo 3

2.4 Respuesta frente a un estímulo inductor de estrés oxidativo: la menadiona

Para evaluar el efecto que presenta un estímulo inductor de estrés oxidativo en las células se analizaron los niveles de producción de O_2^- y la apoptosis celular. En ambos casos, se testó el papel que juega la menadiona (vitamina K_3), ya que se ha demostrado su eficacia como inductor de O_2^- al inhibir procesos mitocondriales importantes como la replicación del ADNmt o la actividad de la fosfatasa.

2.4.1 Determinación de los niveles de producción de O_2^-

Para evaluar si los niveles de producción de O_2^- en condición basal se ven modulados por este estímulo positivo, se incubaron las células durante 1 h en presencia de menadiona.

Los resultados obtenidos se relativizaron frente a la condición basal (sin menadiona) (valor 1). El análisis en los híbridos N y OA mostró que, tras la incubación con la menadiona, los niveles de producción de O_2^- se vieron incrementados de manera significativa con respecto al basal (N **basal** $1 \pm 0,81$ vs **mena** $1,99 \pm 0,84$ $p \leq 0,01$; OA **basal** $1 \pm 0,43$ vs **mena** $2,36 \pm 0,65$ $p \leq 0,0001$), sin embargo, no se observaron diferencias entre híbridos N y OA (Figura 34).

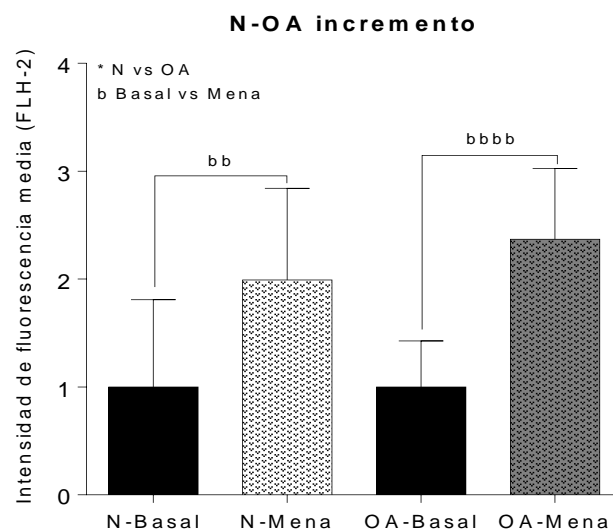


Figura 34 Respuesta al estrés oxidativo tras la incubación con menadiona (Mena) en híbridos N y OA frente con la condición basal (DMEM 4,5+P). Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. *híbridos N y OA. bb $p \leq 0,01$, bbbb $p \leq 0,0001$ basal y presencia de menadiona.

Objetivo 3

2.4.2 Análisis de la muerte celular programada

La muerte celular programada es un mecanismo que utilizan las células de manera natural como respuesta a diferentes estímulos. Se conoce que el aumento del estrés oxidativo produce un incremento en la muerte celular y, teniendo en cuenta el efecto de la menadiona en la producción de ROS descrito anteriormente, se analizó la apoptosis celular bajo la presencia del mismo compuesto mediante citometría de flujo.

El análisis de los *dop-blots* del citómetro de flujo permitió observar que las células, tras su incubación en presencia de menadiona, experimentaron un incremento en el número de células positivas para anexina V e YP (Figura 35).

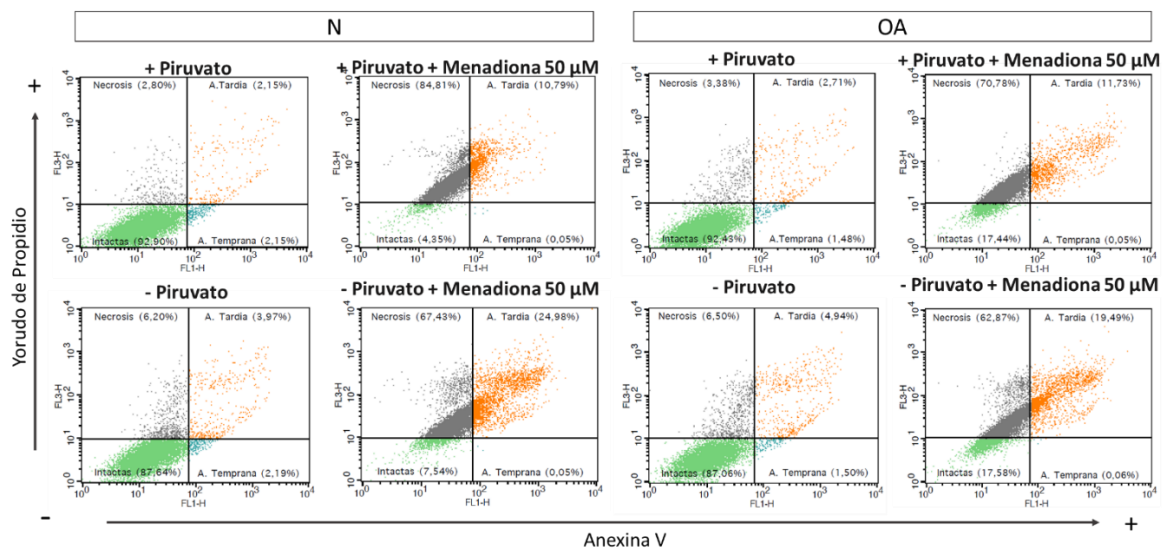


Figura 35 Representación gráfica de la variación de la nube poblacional entre la condición basal y tras incubar las células con menadiona tanto en presencia (+) como ausencia (-) de piruvato.

El análisis de los datos obtenidos reflejó que la incubación con menadiona disminuye significativamente el porcentaje de células intactas, viéndose incrementado el porcentaje de células en apoptosis tardía y necrosis. Cuando las células se cultivaron en ausencia de piruvato, se acentuaron estos resultados, observándose un aumento del porcentaje de células en apoptosis tardía y necrosis (Figura 36 a-c).

Objetivo 3

A pesar de las condiciones a estudio, los análisis entre los cíbridos N y OA y los diferentes haplogrupos de ADNmt no mostraron diferencias entre los grupos (Anexo II- Figura 3).

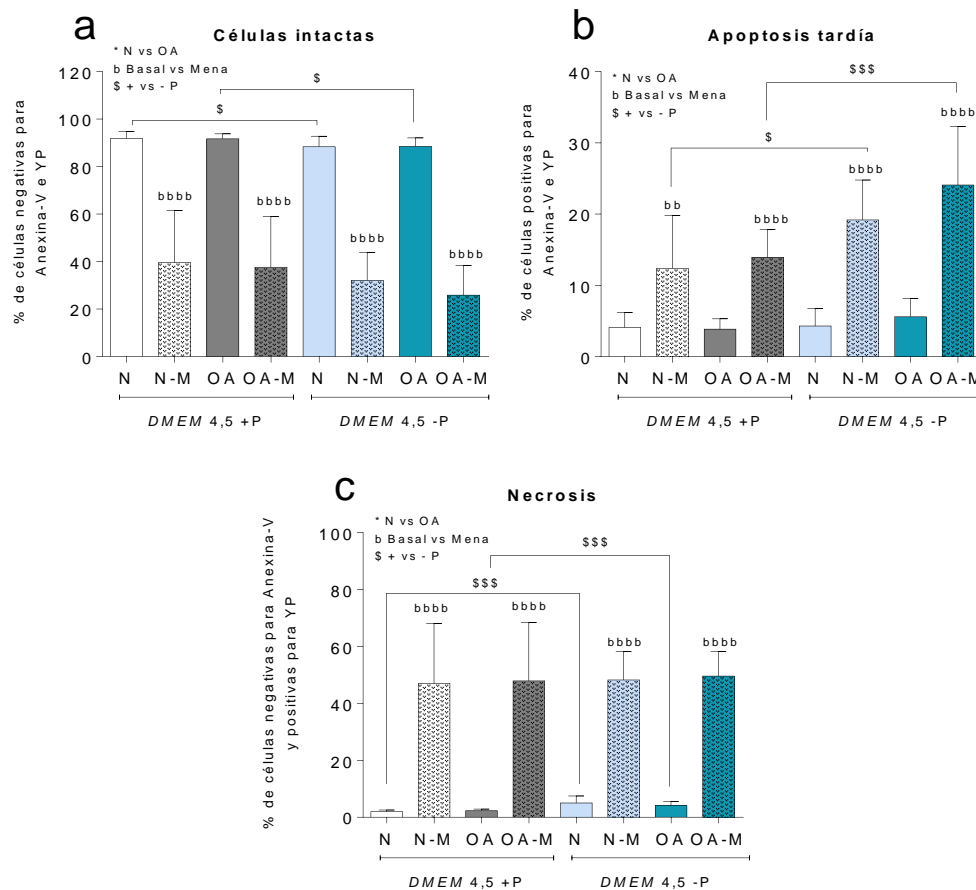


Figura 36 Porcentaje (%) de células marcadas con Anexina-V e YP en presencia (+) y ausencia (-) de piruvato tras ser incubadas con menadiona (M) durante 1 h. **(a)** % de células intactas. **(b)** % de células en apoptosis tardía. **(c)** % de células en necrosis. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. *cíbridos N y OA. \$\$ $p \leq 0,01$, \$\$\$ $p \leq 0,001$ + y -P (piruvato). bb $p \leq 0,01$, bbb $p \leq 0,001$ basal y menadiona. DMEM +P: blanco (N) y gris (OA). DMEM -P: azul claro (N) y oscuro (OA).

2.5 Niveles de expresión génica de las enzimas: NFE2L2 y SOD2 en respuesta al estrés oxidativo

La menadiona, debido a sus características, es un compuesto capaz de generar un escenario de estrés oxidativo celular mediante, al menos, el incremento de ROS. Del mismo modo en el que se muestra en los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de O_2^- , la menadiona puede ser utilizada como un

Objetivo 3

control positivo a la hora de inducir un incremento en el estado oxidativo de la célula generando a su vez un aumento de la apoptosis y la necrosis. Por ello, se analizó su efecto en la expresión génica de la enzima *NFE2L2* que juega un papel fundamental en la respuesta al estrés oxidativo y la enzima *SOD2*, encargada del primer paso de detoxificación del O_2^- .

El análisis de la expresión génica de *NFE2L2* mostró que los híbridos OA presentan niveles de expresión significativamente menores que los N, tanto en condición basal como con menadiona. Sin embargo, la incubación en presencia de este compuesto no moduló los niveles de expresión basales (**basal OA** $0,75 \pm 0,25$ vs **N** $1,23 \pm 0,30$ $p \leq 0,001$; **menadiona OA** $0,89 \pm 0,25$ vs **N** $1,27 \pm 0,36$ $p \leq 0,01$) (Figura 37 a).

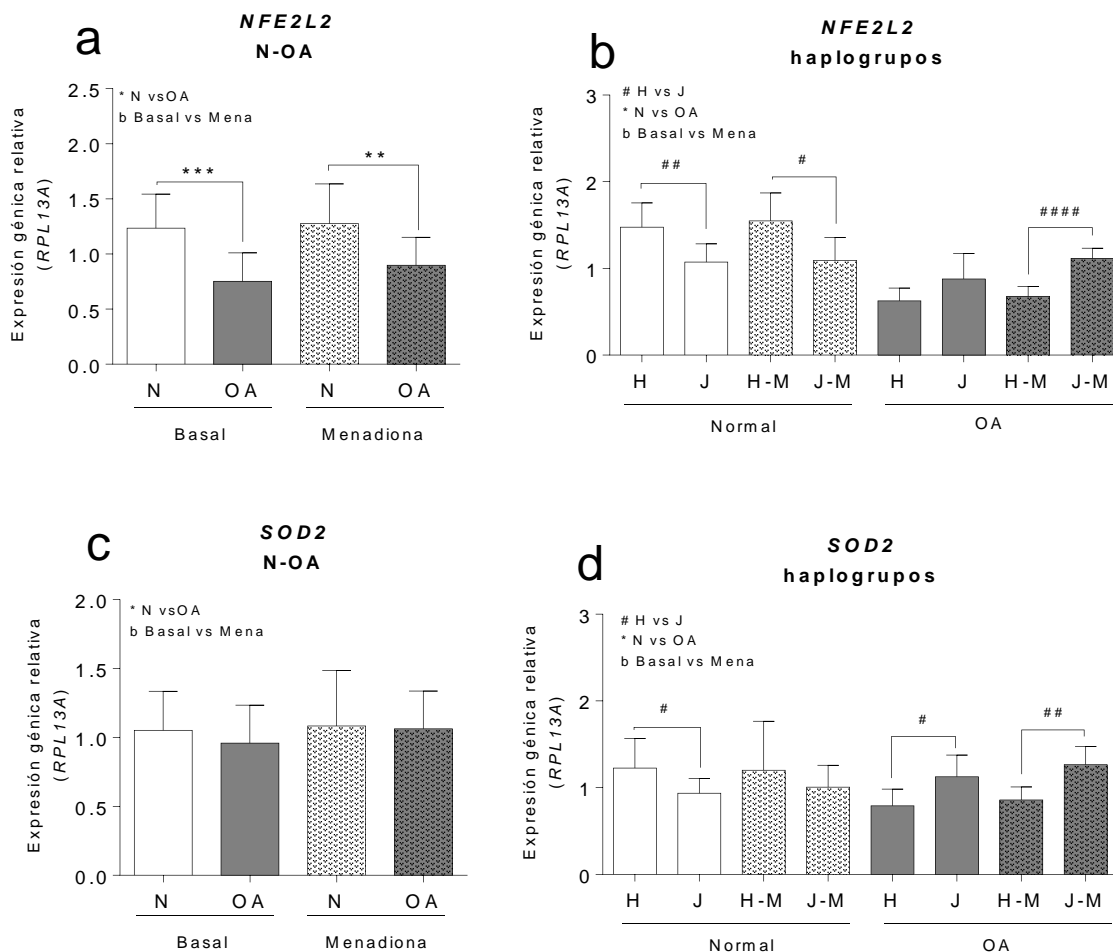


Figura 37 Niveles de expresión génica de *NFE2L2* y *SOD2* en la respuesta al estrés oxidativo en híbridos cultivados en ausencia (basal) o presencia de menadiona (M). **(a)** Niveles de *NFE2L2* entre híbridos N y OA. **(b)** Niveles de *NFE2L2* entre haplogrupos de ADNmt H y J. **(c)** Niveles de *SOD2* entre híbridos N y OA. **(d)** Niveles de *SOD2* entre haplogrupos de ADNmt H y J. Los resultados se

Objetivo 3

expresan media \pm DE de tres experimentos independientes. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ cíbridos N y OA. # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,0001$ haplogrupos H y J. b basal y menadiona.

El análisis entre haplogrupos de ADNmt reflejó que los cíbridos N portadores del haplogrupo de ADNmt J tienen niveles de expresión de *NFE2L2* significativamente menores que los portadores del haplogrupo de ADNmt H, tanto en la condición basal como en presencia de menadiona (**basal N-J** $1,07 \pm 0,21$ vs **N-H** $1,47 \pm 0,27$ $p \leq 0,01$; **menadiona N-J** $1,09 \pm 0,26$ vs **N-H** $1,54 \pm 0,32$ $p \leq 0,05$). Sin embargo, los cíbridos OA portadores del haplogrupo de ADNmt J reflejaron niveles de expresión significativamente más elevados que los H en presencia de menadiona (**OA-H** $0,67 \pm 0,11$ vs **OA-J** $1,11 \pm 0,11$ $p \leq 0,0001$) (Figura 37 b).

El análisis de los niveles de expresión génica de *SOD2* no mostró diferencias entre los cíbridos N y OA (Figura 37 c). Sin embargo, al analizar este parámetro en función del haplogrupo de ADNmt, se observó la misma tendencia descrita anteriormente para *NFE2L2* (**basal N-J** $0,93 \pm 0,17$ vs **N-H** $1,22 \pm 0,34$ $p \leq 0,05$; **basal OA-H** $0,85 \pm 0,14$ vs **OA-J** $1,26 \pm 0,21$ $p \leq 0,01$; **menadiona OA-H** $0,79 \pm 0,19$ vs **OA-J** $1,12 \pm 0,24$ $p \leq 0,05$) (Figura 37 d).

3.- Análisis de la apoptosis celular en presencia de un estímulo inflamatorio: IL-1 β

Teniendo en cuenta la relación existente entre los procesos inflamatorios y la destrucción del cartílago, se estudió la apoptosis celular en presencia de un estímulo positivo de muerte celular, la estaurosporina, y un estímulo inductor de inflamación, la IL-1 β .

Los resultados obtenidos al incubar las células en presencia de IL-1 β mostraron la misma tendencia que cuando las células se crecieron con un control positivo de la técnica, siendo los cíbridos OA los que tuvieron niveles de apoptosis temprana más altos que los N (Figura 38 a y b). Por su parte, no se observaron diferencias ni

Objetivo 3

en la apoptosis tardía ni en la necrosis entre los grupos de cíbridos (N y OA) crecidos en presencia de IL-1 β ni entre los haplogrupos de ADNmt en ninguno de los parámetros analizados (Figura 38 d y e).

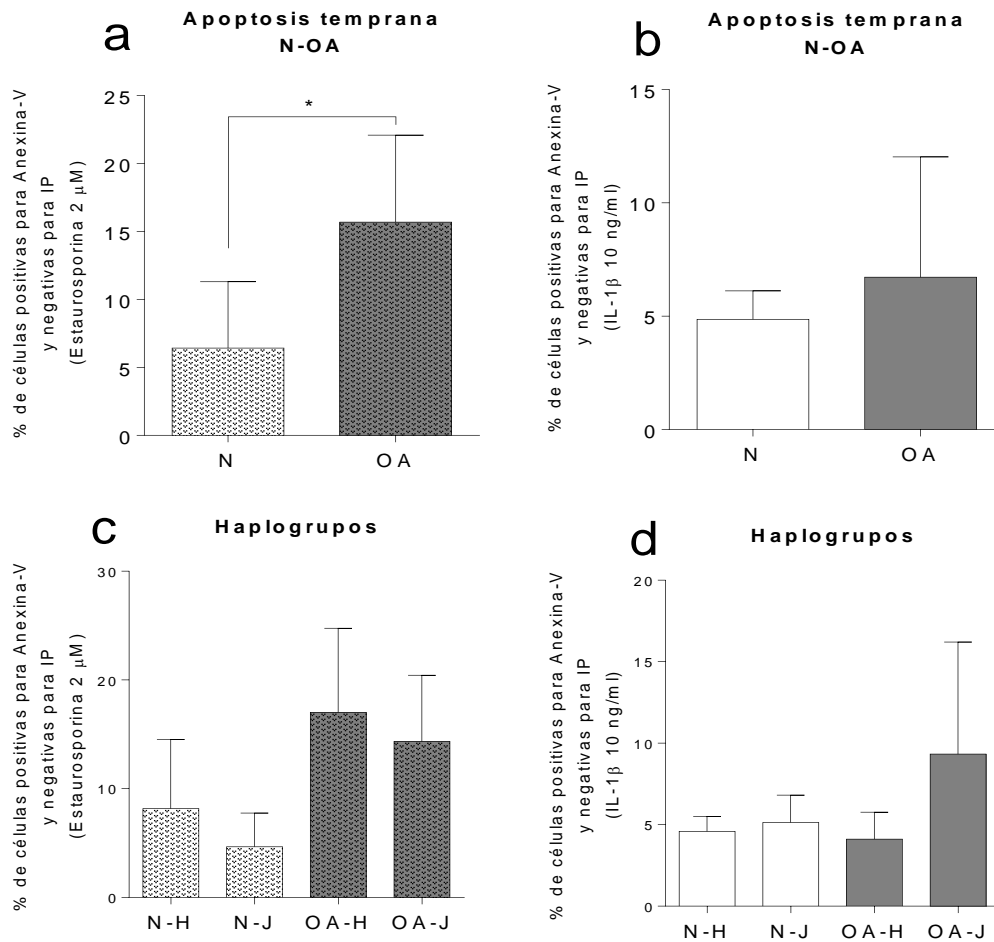


Figura 38 Análisis de la apoptosis celular en presencia de estaurosporina (2 μ M) durante 2 h o en presencia de IL-1 β (10 ng/ml) durante 48 h. **(a-b)** Cíbridos N y OA. **(c-d)** Cíbridos portadores de los haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J.

4.- Determinación de marcadores de autofagia

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente y que la autofagia es un proceso de detoxificación celular (eliminación de componentes celulares dañados), resultó interesante estudiar el estado de este mecanismo a través del análisis de marcadores proteicos mediante *WB* y niveles de expresión génica.

Objetivo 3

La determinación de los marcadores específicos de autofagia se llevó a cabo a través del análisis de las imágenes obtenidas mediante WB a partir del marcaje de las proteínas LC3 y *p-rpS6* (activación de *mTOR*) (Figura 39 a) y de la cuantificación de la expresión génica de *BECN1* y *BCL2*, todas ellas proteínas necesarias en la activación, regulación y formación del autofagosoma.

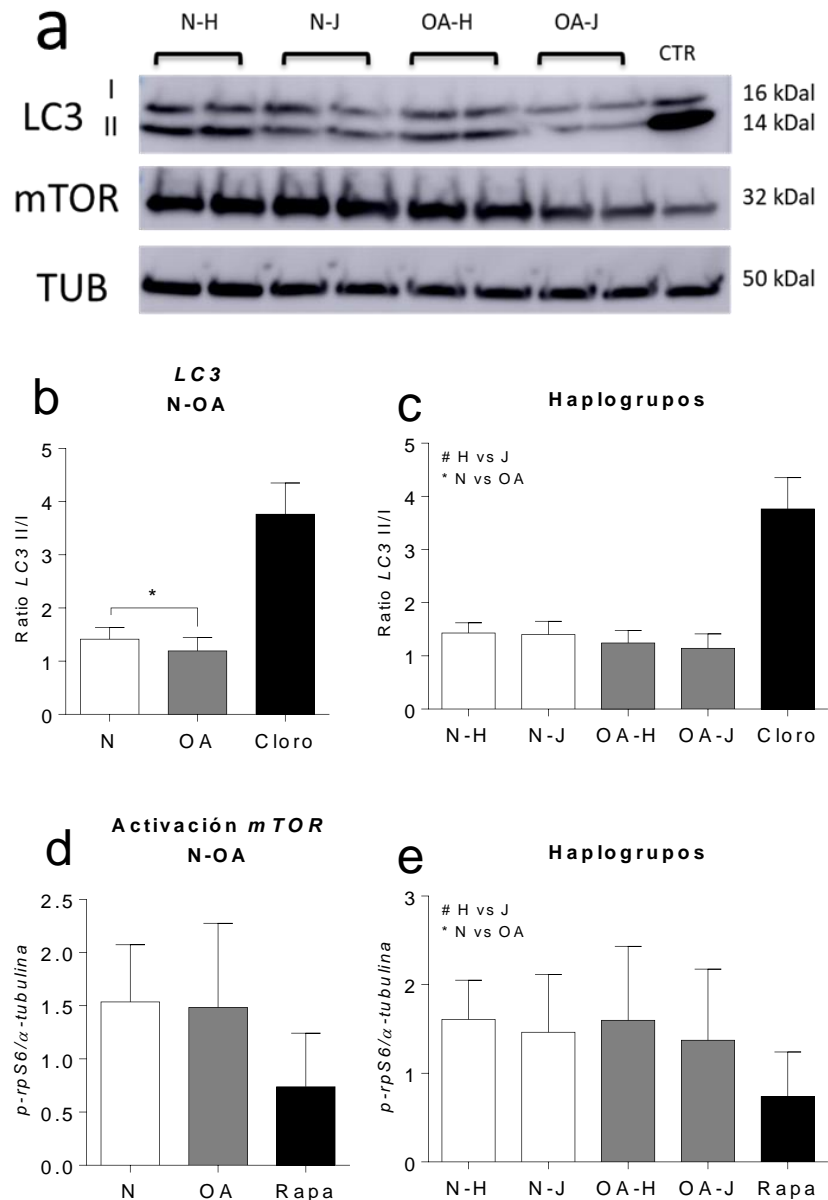


Figura 39 Determinación de marcadores de autofagia mediante WB. **(a)** Imagen representativa de las bandas obtenidas tras marcar las proteínas LC3 y *p-rpS6*. **(b-c)** Representación del ratio entre LC3 II/I en cíbridos N y OA y haplogrupos de ADNmt H y J, respectivamente. **(d-e)** Expresión proteica de *p-rpS6* (activación de *mTOR*) frente a los niveles de α -tubulina en cíbridos N y OA y haplogrupos de ADNmt H y J, respectivamente. Los datos se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J. Cloro: cloroquina. Rapa: rapamicina.

Objetivo 3

El análisis reveló que los cíbridos OA presentan un ratio *LC3 III/I* menor que los N, reflejando una menor activación de la autofagia en estos cíbridos (OA $1,19 \pm 0$ vs N $1,42 \pm 0,21$, $p \leq 0,05$) (Figura 39 b y c). Sin embargo, los niveles de activación de *mTOR* mediante el marcaje de la proteína *p-rpS6* no se vieron modulados (Figura 39 d y e).

Por su parte, la cuantificación de la expresión génica de *BCL2* no mostró ninguna diferencia ni entre los grupos de cíbridos ni los haplogrupos de ADNmt. Sin embargo, *BECN1* siguió la misma tendencia descrita para *LC3II* donde se mostró que los cíbridos OA presentan niveles de autofagia menores que los N (OA $0,89 \pm 0,15$ vs N $1,15 \pm 0,15$, $p \leq 0,001$) (Figura 40 a-c). En este caso, el análisis entre los haplogrupos de ADNmt reflejó que los cíbridos OA-H y OA-J siguen la misma tendencia, siendo los OA-H los que contribuyen de manera significativa a esta diferencia (OA-H $0,86 \pm 0,18$ vs N-H $1,22 \pm 0,06$, $p \leq 0,01$) (Figura 40 d).

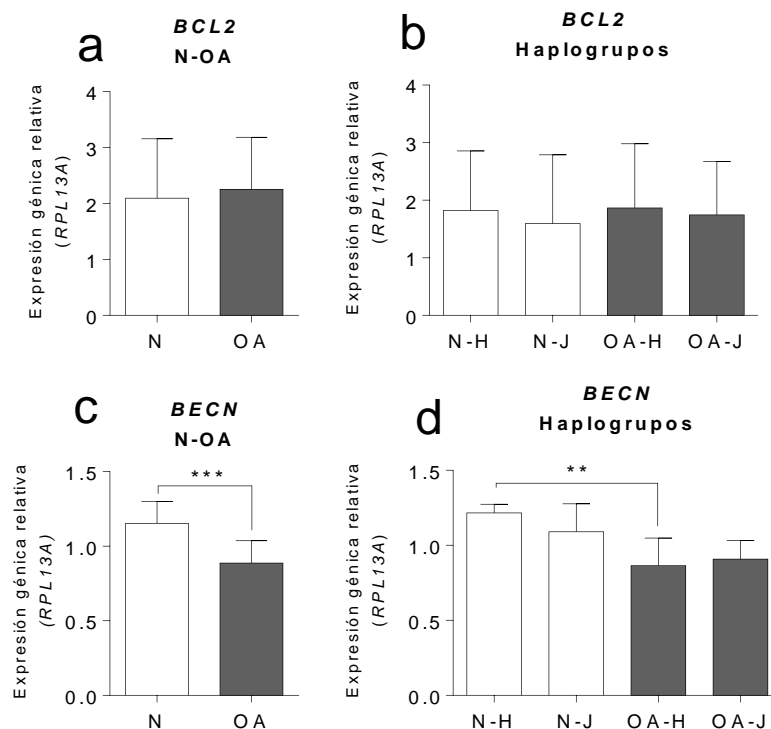


Figura 40 Determinación de marcadores de autofagia mediante expresión génica. **(a-b)** Niveles de expresión génica de *BCL2* en cíbridos N y OA y haplogrupos de ADNmt H y J, respectivamente. **(c-d)** Niveles de expresión génica de *BECN1* en cíbridos N y OA y haplogrupos de ADNmt H y J, respectivamente. Los datos se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J.

Objetivo 3

Los ROS juegan un papel importante en multitud de procesos intracelulares esenciales como la peroxidación de lípidos, la activación de metaloproteinasas de la matriz o diferentes funciones celulares de señalización (169). Sin embargo, en multitud de condiciones patológicas como el desarrollo de cáncer, patologías neurodegenerativas o en el desarrollo de resistencia a insulina, se produce un desequilibrio en la homeostasis celular que modifica el estado redox de la célula e incrementa los niveles de producción de ROS (133, 170, 171).

Los análisis de los niveles de producción de O_2^- reflejaron que los cíbridos OA presentan un nivel de producción mayor que los cíbridos N en todas las condiciones testadas. Estos datos concuerdan con lo descrito por diferentes autores donde, tanto el estrés oxidativo como los niveles de ROS, se ven incrementados en condrocitos de pacientes OA relacionándose con la progresión de la enfermedad (76, 77, 88, 172).

Dado que el tejido articular es considerado un tejido con bajo porcentaje de O_2 y escasa disponibilidad de nutrientes, que se reducen a medida que se profundiza en el cartílago, y teniendo en cuenta que el objetivo principal de esta tesis es validar los cíbridos como un modelo celular *in vitro* adecuado para testar el papel de la mitocondria en la OA, las células se crecieron en bajos porcentajes de O_2 . De este modo, el análisis reflejó que los niveles de O_2^- se mantuvieron prácticamente iguales que en condiciones de normoxia, dato que sorprende ya que, como se describió previamente, la disponibilidad de oxígeno modula la producción de ROS a nivel celular (172, 173).

Objetivo 3

Teniendo en cuenta que *HIF1a* es un factor molecular que se activa y actúa en la regulación de la respuesta celular frente a procesos de hipoxia garantizando la integridad celular (166), una posible explicación radicaría en que el análisis de la expresión de este gen no se vio alterado al crecer las células en bajos porcentajes de O_2 , a pesar de estar disminuida en híbridos OA frente a N, por lo que la respuesta a hipoxia no se vio modulada.

El análisis de los niveles de O_2^- en función de los haplogrupos de ADNmt mostró diferencias entre los híbridos N-H y los OA-H, reflejando un incremento en estos últimos. Este dato corrobora el incremento característico de los niveles de O_2^- durante el proceso artrósico al compararlo con la condición normal (76, 88, 172). Además, esta diferencia se puso de relevancia al eliminar el piruvato del medio de cultivo y al crecer las células en hipoxia.

Por su parte, al eliminar el piruvato del medio de cultivo, los híbridos N-J mostraron unos niveles significativamente más elevados que los N-H. Este dato muestra cierta discrepancia con lo explicado en la literatura, donde se describió que los híbridos H producen más O_2^- que los J (101). Si bien es cierto que en ese trabajo se utilizaron únicamente híbridos generados a partir de donantes N y en condiciones estándar de cultivo. Es posible que esta discordancia sea debida al efecto enmascarador de la presencia de piruvato en el medio de cultivo (174) y que, cuando este deja de estar presente, se produzca el incremento de los niveles de O_2^- en condición de alto porcentaje de O_2 . Sin embargo, cuando las células se crecieron en bajo porcentaje de O_2 los datos obtenidos en este trabajo concuerdan nuevamente con los descritos en la literatura (101).

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de piruvato en el medio de cultivo compromete la producción de O_2^- . En la literatura se describe un efecto protector de este metabolito debido a su capacidad de neutralizar el peróxido de hidrógeno y el de otros ROS a nivel celular, protegiendo a las células frente al estrés

Objetivo 3

oxidativo y la muerte celular (174-177). Así, la ausencia de piruvato en el medio de cultivo puede considerarse una condición para desenmascarar las diferencias existentes entre las células, ya que estas requieren hacer un mayor esfuerzo metabólico para transformar la glucosa hasta el piruvato y obtener energía mediante la mitocondria, creando una situación de estrés que aumenta la producción de *ROS*. Hoy en día, se ha descrito que los híbridos N-J son más glucolíticos y presentan una respiración basal más baja que los N-H (80, 122, 128), por lo que es posible que este estatus les confiera una mayor susceptibilidad a la hora de crecer en ausencia de piruvato, provocando un incremento de sus niveles de O_2^- .

El análisis comparativo entre dos concentraciones de glucosa reflejó una disminución en los niveles de producción de O_2^- en aquellas células cultivadas en baja concentración de glucosa. Según aparece descrito en la bibliografía, un aumento de la glucosa en el medio de cultivo celular estimula tanto la producción excesiva de O_2^- como de H_2O_2 e inhibe gradualmente la actividad de enzimas detoxificadoras, provocando un aumento del daño mitocondrial a través de la fragmentación del ADNmt, la pérdida de integridad de la membrana mitocondrial y la disminución de su potencial, procesos que aceleran una respuesta inflamatoria y finalmente conllevan a la muerte celular (178). Además, estos datos concuerdan con los descritos por otros autores que pusieron de manifiesto el papel de una alta concentración de glucosa en el medio de cultivo como inductor de O_2^- en condrocitos. En este caso, los condrocitos OA no son capaces de modular la expresión génica de los transportadores de glucosa (mayor concentración exterior, mayor expresión génica) con lo que, bajo altas concentraciones de glucosa, los niveles de *ROS* se vieron incrementados debido a una alta acumulación de glucosa en el interior celular (113, 179).

El aumento de los niveles de *ROS* puede activar múltiples sensores y vías que regulan el sistema detoxificador, entre ellos se puede destacar *NFE2L2*. La

Objetivo 3

expresión génica de *NFE2L2* de los híbridos OA fue menor que en los N. *NFE2L2* contribuye al proceso antiinflamatorio y regula la expresión génica a través del elemento de respuesta antioxidante (ERA) (180) siendo la vía *NFE2L2*-ERA un mecanismo intrínseco de defensa contra el estrés oxidativo (181). Un dato interesante se observó a la hora de analizar este parámetro en función de los haplogrupos de ADNmt, donde se reflejó que los híbridos N-J tuvieron una menor expresión de esta enzima que los N-H, lo que sigue la misma línea descrita anteriormente.

Dentro de los sistemas detoxificadores implicados en la eliminación de O_2^- en la mitocondria destaca *SOD2*. La expresión de *SOD2* no reflejó ninguna modulación entre los híbridos, sin embargo, en la literatura está descrito que los condrocitos OA muestran niveles más bajos de esta enzima (90, 182, 183). Esta discrepancia entre ambos resultados puede deberse a que los estudios mencionados se basan en niveles de expresión proteica y no tienen por qué coincidir con los resultados de expresión génica. *SOD2* convierte el O_2^- generado en la CTE en H_2O_2 . Este producto es altamente difusible y facilita la prolongación de la señal redox desde la mitocondria hasta el resto celular. Por ello, recientemente se ha puesto de manifiesto que esta enzima juega un papel fundamental en la regulación de las comunicaciones intracelulares. Un ejemplo es que la producción y regulación de H_2O_2 es indispensable para la estabilización de *HIF* y por tanto de la activación de la respuesta a hipoxia (184). Así, es posible que la expresión proteica de *SOD2* en los híbridos OA esté, o bien modulada (como se ha descrito en condrocitos), o bien sea una proteína disfuncional. Debido a que, a pesar de tener los mismos niveles de expresión génica que los N, los híbridos OA mostraron mayor producción de O_2^- y menor expresión de *HIF1 α* . Es decir, estos híbridos presentan un mecanismo de detoxificación deficiente y una interrumpida comunicación celular desde la mitocondria, que no permite activar una respuesta celular adecuada. Por otro lado, cabe destacar que, a la hora de analizar los híbridos OA, se observó que los J

Objetivo 3

presentan una mejor respuesta frente al estrés oxidativo a través del incremento de la expresión génica de enzimas detoxificadoras. Esto pone de manifiesto que el haplogrupo de ADNmt J podría contribuir a la protección frente al estrés oxidativo a través de un mecanismo de detoxificación celular más eficiente que los H durante el proceso artrósico.

El empleo de sustancias que inducen la producción de *ROS* es un método que permite poner de manifiesto la respuesta celular frente al estrés oxidativo. Uno de los compuestos más utilizados en la literatura es el H_2O_2 , como inductor directo de *ROS* ya que altas concentraciones de este compuesto inducen un aumento de los niveles de *ROS* y disminuyen la viabilidad celular por el incremento del estrés oxidativo. Al igual que se ha descrito en la literatura, la incubación en presencia de H_2O_2 reflejó que los híbridos OA son más susceptibles al efecto de este compuesto mostrando una peor respuesta celular (103, 174, 185). No obstante, a la hora de evaluar la apoptosis celular mediada por estrés oxidativo en los híbridos se empleó la menadiona ya que es un compuesto descrito como un inductor indirecto de estrés oxidativo porque actúa a nivel mitocondrial generando O_2^- a partir del O_2 molecular (76, 163, 186).

La evaluación de los resultados obtenidos en presencia de menadiona puso de manifiesto el papel que juega este compuesto en el interior celular como inductor indirecto de estrés oxidativo. Este compuesto estimuló positivamente la producción de O_2^- y la muerte celular por apoptosis tanto en los híbridos N como los OA. El daño producido por la menadiona en el modelo celular reflejado mediante el incremento de los niveles de O_2^- apunta en la misma dirección descrita por Reed y colaboradores, donde la menadiona indujo un incremento de la producción de *ROS* en los condrocitos que, además, se mantenía en el tiempo de manera significativa, creando un escenario característico de estrés oxidativo (76). A la hora de evaluar los datos obtenidos de la expresión génica de *NFE2L2* en presencia de menadiona, los híbridos no mostraron un aumento significativo con

Objetivo 3

respecto al basal pese haber observado que los niveles de producción de O_2^- se elevaron tras la incubación con este compuesto. A pesar de que se ha descrito que es una interacción débil, una posible explicación es que la menadiona podría actuar frente al sistema *NFE2L2-Keap1*, que es reconocido como un importante mecanismo de defensa celular contra el estrés oxidativo (186, 187). En este caso, Keap1 secuestra *NFE2L2* a nivel citoplasmático y lo dirige a su degradación, cuando el sistema se rompe y Keap1 libera *NFE2L2*, este logra la estabilización y se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de genes del grupo ERA generando una respuesta frente al estrés oxidativo (188). Esto ocurre a nivel de proteína, por lo que los niveles de expresión génica de *NFE2L2* no se tienen por qué ver modulados frente a la incubación con menadiona, siendo necesario profundizar en el estudio de la expresión proteica de *NFE2L2*. A la hora de evaluar la muerte celular en presencia de este compuesto, los resultados reflejaron un incremento en la mortalidad celular frente a la condición basal. Así, estos datos apuntan en la misma dirección que los datos descritos en la literatura donde se ha propuesto que la menadiona interfiere tanto en el transporte electrónico de la CTE, como en el mantenimiento del gradiente de protones, lo que impide la transferencia de los electrones desde el oxígeno hasta la formación de ATP, disminuye la síntesis de energía e incrementa los niveles de producción de ROS iniciando el proceso de muerte celular (189, 190).

Hoy en día se conocen diversos mecanismos de respuesta celular que dependen del estímulo, del tejido o de la naturaleza de la célula (111). No obstante, durante el desarrollo de la OA, la disfunción mitocondrial se encuentra asociada a condrocitos de pacientes con esta patología donde, además, la celularidad del cartílago disminuye (152, 153). Por ello, se ha descrito que, a la hora de afrontar un escenario de estrés oxidativo, uno de los principales mecanismos de respuesta con los que cuenta un condrocito es la apoptosis (133). La apoptosis es un mecanismo molecular complejo por el cual la célula programa su muerte mediante una cascada

Objetivo 3

de señalización que se activa por diferentes vías, logrando así su defensa frente a una situación fisiológica no óptima para las condiciones de desarrollo (149).

Tras la determinación de este parámetro al incubar las células en presencia de estaurosporina e IL-1 β , se observó que los híbridos OA responden incrementando el porcentaje de células en apoptosis temprana que los N, dato que pone de manifiesto que los híbridos OA son más sensibles que los N frente a estos estímulos.

Actualmente se ha puesto de manifiesto en la literatura que uno de los factores implicados en el desarrollo de la OA es un bajo componente inflamatorio constante en el tiempo, es decir, un grado de inflamación crónico en los primeros estadios que desencadena una respuesta catabólica a nivel del condrocito y culmina en la disfunción metabólica de la propia célula (191-193). Una de las citoquinas que ha sido ampliamente relacionada con el desarrollo de la OA es la IL-1 β . Parece que los híbridos generados a partir de plaquetas de donantes OA presentan una respuesta más severa frente a este estímulo pro-inflamatorio, incrementando la muerte celular, dato que apoya los resultados descritos en la literatura en condrocitos (194). Es posible que, al retirar este compuesto del medio de cultivo, y cesar la simulación de un escenario inflamatorio mantenido en el tiempo, los niveles de apoptosis de las células se vean revertidos a los niveles basales, no obstante, sería necesario profundizar en el estudio de la muerte por apoptosis frente a este compuesto y los mecanismos de reparación celular.

En base a estos datos, y teniendo en cuenta lo descrito en la literatura, cabe destacar el concepto de condroptosis. Hoy en día es difícil conocer la cantidad de condrocitos apoptóticos que puede haber en el cartílago debido a que, durante el propio desarrollo de la enfermedad, la celularidad disminuye drásticamente. Sin embargo, se ha descrito que estas células son capaces de activar un mecanismo apoptótico propio cuyas características difieren de las que clásicamente ocurren

Objetivo 3

durante la apoptosis celular, lo que se definió como condroptosis (147). Una de las principales características de este mecanismo es la acumulación de vacuolas procedentes de la activación de la autofagia, es decir, una gran acumulación de compuestos de desecho (150). El análisis de la determinación de los marcadores de autofagia LC3 llevado a cabo en este objetivo de tesis, mostró que los cíbridos OA poseen niveles proteicos disminuidos en comparación con los cíbridos N. Este dato sigue lo descrito en la literatura donde, tras estudiar la autofagia en condrocitos de pacientes OA, estos presentaron menor activación de este proceso en relación con los N (154). En el caso de los condrocitos, la autofagia se ha definido como un proceso citoprotector por el cual la propia digestión de estos compuestos permite sostener el nivel de energía necesario para la célula y, por tanto, mantener la homeostasis entre la producción y la eliminación de sustancias celulares (157). Así, la disfunción mitocondrial que muestran los cíbridos OA y la susceptibilidad frente al estrés oxidativo apuntan en la misma dirección que lo descrito en los condrocitos durante el proceso artrósico, donde se observa que presentan un desequilibrio entre los procesos anabólico-catabólicos y los mecanismos de protección-reparación deficientes.

Un dato interesante que aparece descrito en la literatura es que los condrocitos OA con disfunción mitocondrial presentan un defecto en la autofagia y que la reactivación de este mecanismo mediante rapamicina, inhibidor de *mTOR*, protege del daño mitocondrial a las células (160). Sin embargo, pese a que esta vía no se vio modulada en los cíbridos, se observó una reducción de los niveles de expresión de *BECN1* en los cíbridos OA que constituye otra de las vías de activación de la autofagia. Esta consiste en la formación de un complejo de nucleación denominado complejo PI3k, que forma parte de la inducción de las primeras fases de la autofagia (155, 156). En contraste, cabe destacar que los niveles de expresión génica de *BCL2*, proteína que se une a *BECN1* e inhibe su actividad (157), no se vieron modulados entre los diferentes grupos de cíbridos (N-OA). Una posible hipótesis

Objetivo 3

que podría explicar esta discordancia es que *BCL2* modula la función de *BECN1* a nivel proteico y en el citoplasma, por lo que los niveles de expresión de *BECN1* disminuidos en los cíbridos OA podrían verse regulados al nivel de expresión génica por otras rutas (195). En concreto, en estudios previos se ha descrito que la regulación de la expresión génica de *BECN1* se modula positiva o negativamente por la acción de la p65/NF- κ B, que depende del estado celular y fisiológico (196). No obstante, hoy en día carecemos de suficiente conocimiento para establecer este tipo de relaciones, por lo que sería interesante profundizar en el estudio del mecanismo de autofagia en los cíbridos transmitocondriales y mejorar nuestro conocimiento acerca del papel que juega la mitocondria en estos procesos en el desarrollo de la OA.

Los parámetros analizados correspondientes a este apartado del trabajo de tesis se relacionan con procesos moleculares asociados con el desarrollo de la enfermedad. Así, aspectos como el estrés oxidativo, la apoptosis o la autofagia celular se estudiaron previamente tanto a nivel del cartílago como en condrocitos utilizando células o modelos de animales, sin embargo, ninguno de ellos permite conocer el efecto que el ADNmt mitocondrial (sano o patológico) tiene en estos parámetros. Con ello, todos los datos obtenidos a partir de los cíbridos transmitocondriales a lo largo de este objetivo ponen de manifiesto la respuesta diferencial entre aquellos portadores del ADNmt de pacientes sanos (N) y de pacientes con OA. Por lo tanto, se mostró que, bajo el mismo fondo nuclear, los cíbridos OA presentan mecanismos moleculares de reparación diferentes que se relacionan con un incremento de ROS, mayor apoptosis frente a estímulos negativos y una menor autofagia.

OBJETIVO 4

Análisis del estatus metabólico del modelo celular generado.

Objetivo 4

El metabolismo de una célula se compone de numerosas rutas orquestadas simultáneamente cuyo objetivo es cubrir las necesidades celulares y el requerimiento energético para la supervivencia celular. La mitocondria juega un papel fundamental en el metabolismo celular, ya que en este orgánulo celular es donde a partir del carbono y del consumo de O₂ se obtiene energía en forma de ATP. Este carbono es originado principalmente a partir de dos vías metabólicas, la de la glucosa y la de los ácidos grasos (197). Así, entre las rutas metabólicas relacionadas principalmente con estos dos metabolitos y que se hayan entre las más importantes de la célula, destacan tres principalmente: la glucólisis, el ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) y la oxidación de los ácidos grasos (β -oxidación), y aunque la mitocondria no juega un papel principal en todas ellas, su función siempre se ve involucrada de una u otra manera (91). En condiciones normales, a pesar de que el metabolismo de la glucosa se lleve a cabo mayormente en el citoplasma celular, su producto final, el piruvato se incorpora al TCA que tiene lugar en el interior mitocondrial (198).

Una vez en el interior celular, el piruvato, a través de la acción de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), se transforma en Acetil-CoA. Este compuesto se incorpora al TCA generando carbono como producto final en forma de CO₂ y poder reductor (NADH y FADH₂), que se utilizarán posteriormente como sustratos en la CTE para producir energía mediante el acoplamiento de esta con la fosforilación oxidativa. Los ácidos grasos, por su parte, una vez que han sido incorporados al interior celular, o bien se acumulan en forma de gotas lipídicas (*lipid droplets- LDs*) o bien entran en la mitocondria, donde tiene lugar la oxidación de los mismos a través de la β -oxidación. Para ello, los ácidos grasos deben interactuar con una molécula de carnitina y, mediante el transportador *carnitine*

Objetivo 4

palmitoyltransferase-1 (CPT1b) entran al interior mitocondrial donde tras la β -oxidación se incorporan al TCA en forma de Acetil-CoA dando lugar a la producción de CO_2 y poder reductor (NADH y FADH_2) para, posteriormente, obtener energía (115, 197) (Figura 41).

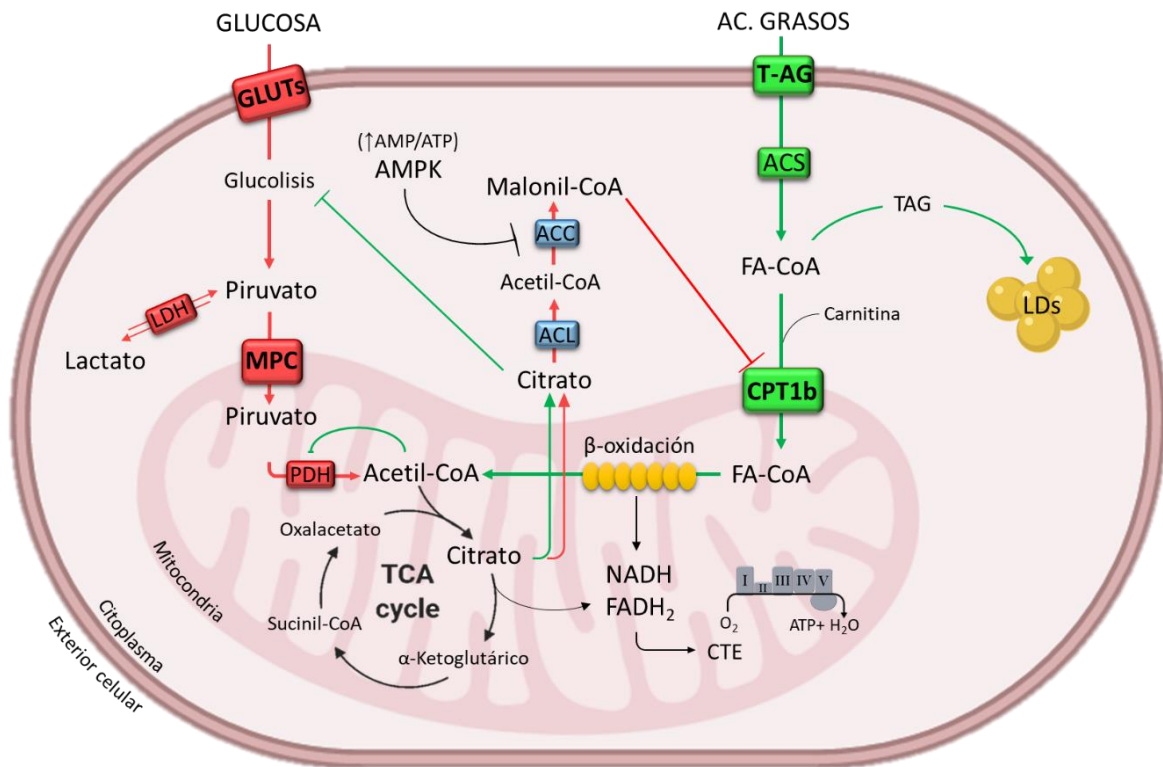


Figura 41 Representación del metabolismo de la glucosa (vías marcadas en rojo) y de los ácidos grasos (vías marcadas en verde) en el interior celular.

Ambos metabolismos descritos anteriormente se regulan de manera recíproca a través de metabolitos intermediarios. Cuando la célula consume grandes cantidades de glucosa, se restringe la β -oxidación mediante la inhibición de *CPT1b* por el aumento de la concentración citoplasmática de malonil-CoA, favoreciéndose la obtención de Acetil-CoA mediante la glucólisis y el piruvato (115). En el caso contrario, cuando la célula consume más ácidos grasos, la elevada producción de Acetil-CoA y citrato por la β -oxidación inhiben la glucólisis así como los niveles de PDH.

Objetivo 4

En un medio fisiológico cambiante donde se encuentran multitud de sustratos, a diferentes concentraciones, cabe destacar un mecanismo celular capaz de regular el metabolismo interno de la propia célula: el ciclo de Randle. El ciclo de Randle es un mecanismo molecular cuya principal característica reside en la competición de la glucosa o los ácidos grasos por ser sustratos metabólicos de una célula (199, 200). Así, por ejemplo, como se describió anteriormente, un elevado consumo de glucosa aumenta la glucólisis y la producción de piruvato, que incrementan la concentración de malonil-CoA, el cual bloquea *CPT1b* inhibiendo por tanto la β -oxidación (197, 200). Mientras que, en el caso opuesto, un aumento de la oxidación de los ácidos grasos incrementa la cantidad de Acetil-CoA disponible por lo que se inhibe la actividad de la PDH. En condiciones de estrés oxidativo y déficit de energía, se produce un desajuste de los niveles del sensor de estrés de *AMPK*, que disminuyen la concentración de malonil-CoA y favorece la oxidación de ácidos grasos porque el balance energético es mayor tras el metabolismo de estos (197, 200) (Figura 41).

Ambos metabolismos y su regulación se han relacionado cada vez más con diferentes patologías. Así, una de las características principales en el desarrollo de enfermedades como el cáncer o patologías neurodegenerativas, es el aumento de la capacidad glucolítica y la disminución de la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial (91). Bajo condiciones donde el oxígeno está presente, las células generalmente obtienen la mayor parte del ATP mediante la fosforilación oxidativa mitocondrial, pero, en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (hipoxia), son capaces de alterar su metabolismo obteniendo la mayor parte de su energía mediante la glucólisis, lo que se conoce como efecto Warburg (201).

El mantenimiento de la homeostasis energética depende de multitud de procesos como la detección del sustrato, el tráfico de moléculas, la señalización, el almacenamiento, la oxidación, la disponibilidad del sustrato y el requerimiento energético (200). Bajo condiciones adversas, la mayoría de las células modifican su

Objetivo 4

metabolismo energético, pasando de un estado de relajación a un estado metabólicamente activo que mantiene la homeostasis energética y la viabilidad celular. En consecuencia, como respuesta frente a un incremento de la disponibilidad de un sustrato, se potencian las rutas catabólicas, mientras que cuando la disponibilidad del sustrato se ve restringida la actividad hidrolítica y lipolítica, se aumenta (91). Así, la habilidad de una célula para ajustar la oxidación de un sustrato en función de la disponibilidad de este se conoce como flexibilidad metabólica (199, 200, 202), y permite que la propia célula se adapte en concordancia a los cambios metabólicos o de demanda energética en función de la actividad o condición predominante (203). Este concepto se describió con el objetivo de explicar cómo una célula era capaz de modificar su predominante metabolismo lipídico con una alta tasa de consumo de ácidos grasos, a un metabolismo más glucolítico tras un periodo de ayuno (204).

La regulación de la función mitocondrial es esencial en la flexibilidad metabólica ya que, en última instancia, la mitocondria es la que recibe los intermediarios del sustrato catabolizados para generar poder reductor, energía, agua y CO₂ (200, 205). La morfología mitocondrial es dinámica y sensible a las alteraciones metabólicas, dependiendo esencialmente de la demanda energética y del estatus nutricional de la célula. Por ello, procesos como la biogénesis mitocondrial, la fusión y fisión mitocondrial y la mitofagia modifican tanto estructural como funcionalmente la red mitocondrial de la célula, para adaptarse a un perfil bioenergético concreto (206). Así, se ha descrito la relación que existe entre la disfunción metabólica y el equilibrio en los procesos de fusión y fisión, ya que un correcto balance entre estos procesos permite que la célula sea capaz de adaptarse a los requerimientos nutricionales en cada momento (26, 207).

En los últimos años, se ha generado un gran interés en estudiar cómo a través de la pérdida de la flexibilidad metabólica se puede dar lugar a la acumulación de sustratos, tanto a nivel celular como tisular. Hoy en día se conoce que una

Objetivo 4

flexibilidad metabólica insuficiente provoca una reducción en la oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial. Dependiendo del tipo de célula y de la disponibilidad del sustrato, esto puede conducir a la acumulación de los mismos a nivel citoplasmático (202). Este exceso se conoce como lipotoxicidad y está caracterizado por producir un desequilibrio en el metabolismo de los ácidos grasos desencadenando una respuesta inflamatoria que activa cascadas de señalización que conducen al incremento del estrés oxidativo y, finalmente, a la muerte celular (203, 208, 209).

Hasta ahora se ha demostrado que la OA es una enfermedad multifactorial, donde el estrés oxidativo parece jugar un papel importante. Está caracterizada por presentar un bajo grado de inflamación crónica que, junto al fallo de los sistemas de reparación, favorece el desequilibrio entre procesos anabólicos y catabólicos afectando la homeostasis celular y a la función mitocondrial (125, 192, 210). Del mismo modo, se ha puesto de manifiesto la relación que existe entre un incremento gradual de la acumulación de ácidos grasos en el cartílago y el desarrollo y progresión de la enfermedad (211, 212). Así, pese haber observado que la glucosa es uno de los sustratos más importantes en el metabolismo de los condrocitos debido a las características que presenta el cartílago articular (Figura 42), se sabe que los condrocitos son células mayormente glucolíticas que obtienen aproximadamente el 25% de energía a través de la mitocondria (182). Sin embargo, como se describió anteriormente, el mantenimiento de la homeostasis de los condrocitos OA es insuficiente cuando se produce un incremento de la disponibilidad de glucosa. En este caso, los condrocitos OA no son capaces de modular la expresión de los transportadores de este sustrato y controlar su oxidación, lo que provoca un aumento del consumo del mismo y modifica el estado redox de la célula, incrementando los niveles de producción de ROS (113, 133, 170, 171, 179). Además, los resultados descritos hasta el momento revelan que necesitan tanto la glucosa como los ácidos grasos para obtener energía, para

Objetivo 4

incorporarlos como componentes estructurales o como elementos de señalización en la célula (91, 213). Por ello, se ha descrito que la disfunción mitocondrial y la alteración del metabolismo de los ácidos grasos podrían jugar un papel muy importante a nivel de los condrocitos, ya que se relacionan con procesos de muerte celular y destrucción del cartílago (212, 214, 215).

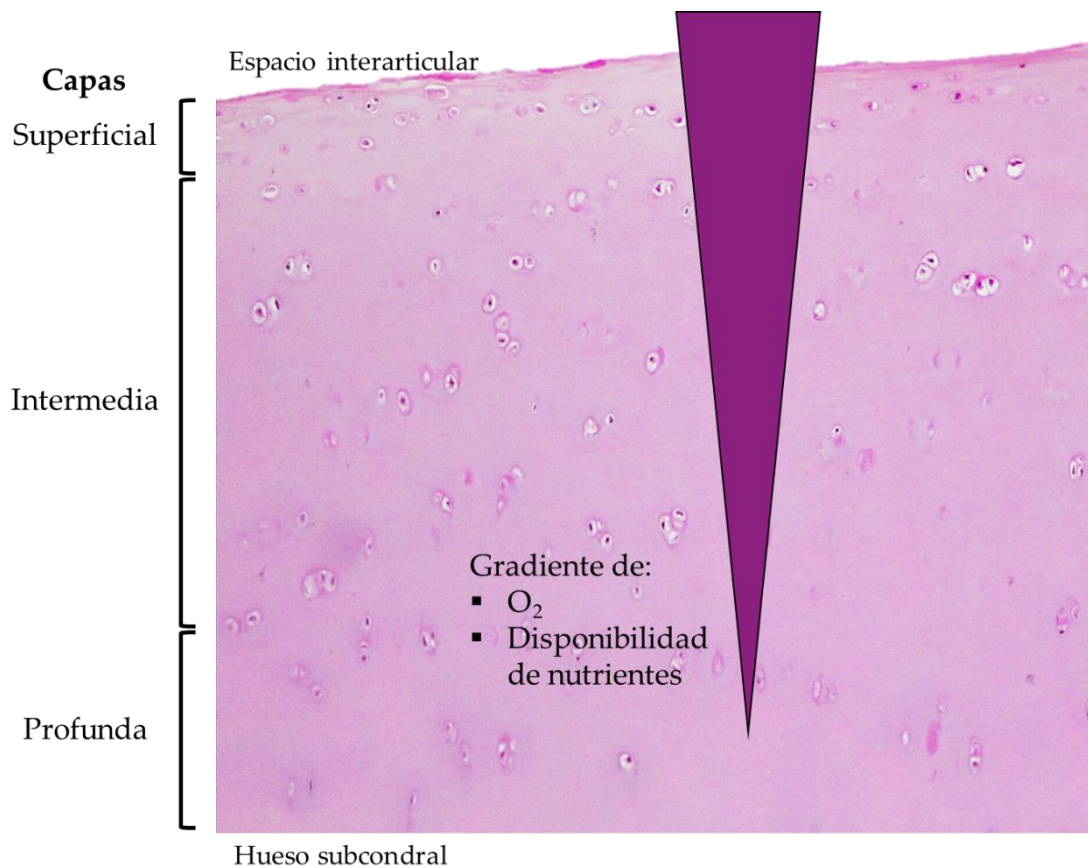


Figura 42 Gradiente de difusión del O_2 y de la disponibilidad de nutrientes desde el espacio interarticular hasta el hueso subcondral a lo largo de las diferentes capas que forman el cartílago articular.

Por todo ello, la finalidad de este objetivo de tesis fue estudiar el papel de las mitocondrias procedentes de pacientes sanos (N) y artrósicos (OA) en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos, con especial atención en el concepto de flexibilidad metabólica, analizando el efecto que diferentes nutrientes pueden tener en el metabolismo celular.

Objetivo 4

Para llevar a cabo el desarrollo de este objetivo centrado principalmente en el estudio del metabolismo celular, se utilizaron diferentes medios de cultivo cuya composición y nomenclatura (utilizada a partir de ahora) se describen en la Tabla 17.

Tabla 17 Características y composición de los medios de cultivo empleados para en este objetivo.

	<i>GLUCOSA</i>	<i>ÁCIDO OLEICO</i>	<i>PIRUVATO</i>
<i>DMEM 4,5 +P</i>	4,5 gr/L	-	1 mM
<i>DMEM 4,5 -P</i>	4,5 gr/L	-	-
<i>DMEM 1 +P</i>	1 gr/L	-	1 mM
<i>DMEM 1 -P</i>	1 gr/L	-	-
<i>DMEM glu/ole</i>	1 gr/L	100 μ M	1 mM
<i>DMEM ole +P</i>	-	100 μ M	1 mM

P: piruvato. Glu: glucosa. Ole: oleico.

1.- Estudio de la glucolisis mediante el análisis de la tasa de acidificación extracelular (ECAR)

La determinación del estatus glucolítico de los cíbridos transmitocondiales se llevó a cabo mediante el estudio y análisis de la ECAR utilizando *Seahorse Bioscience XFp Extracellular Flux Analyzer*. Esta técnica permite el estudio de parámetros relacionados con la función glucolítica. Como se vio anteriormente, la principal característica de esta técnica es que, mediante la inyección seriada de diferentes moduladores del metabolismo glucolítico y mitocondrial, se pueden evaluar parámetros claves de la función metabólica ya que se realizan medidas a

Objetivo 4

tiempo real de la concentración de H^+ en el medio en el que se encuentran las células.

Del mismo modo en el que se describió en el Objetivo 1 en el apartado 3.2, se sembraron 2×10^4 células por pocillo en una placa de cultivo de 8 pocillos (*cell culture miniplates 8 wells XFp* Agilent Seahorse XFp) con distribución equiparable a una MW-96. Los experimentos se realizaron creciendo las células en DMEM 4,5+P.

1.1 Determinación de la capacidad glucolítica a través de la tasa de acidificación extracelular (ECAR)

La glucosa es uno de los principales sustratos que las células utilizan para la obtención de energía. Por ello, una vez que la glucosa es asimilada y se encuentra en el interior celular, ésta se metaboliza hasta piruvato (glucolisis) con el objetivo de conseguir energía a través de la CTE y TCA. Estos procesos dan lugar a liberación de H^+ al medio extracelular que rodea la célula produciendo su acidificación. La variación del nivel de H^+ en el exterior es detectado por el *Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer*, que mide su incremento y lo proporciona como un ratio de acidificación extracelular (ECAR).

Para determinar el metabolismo glucolítico de las células, se utilizó el kit *XFp Glycolysis Stress Test* (Seahorse Bioscience) siguiendo la metodología detallada por el fabricante, representada esquemáticamente en la Figura 43.

Brevemente, tras 24 h de cultivo, las células se incubaron en el medio de cultivo específico a pH 7,4 (*XFp Base Medium*) suplementado con glutamina a 2 mM, durante 1 h en estufa de cultivo a 37°C sin CO_2 con el propósito de eliminar el oxígeno residual. Tras este periodo de incubación, se cargan los inhibidores en cada uno de los puertos del capuchón, como se describe a continuación (Figura 44):

Objetivo 4

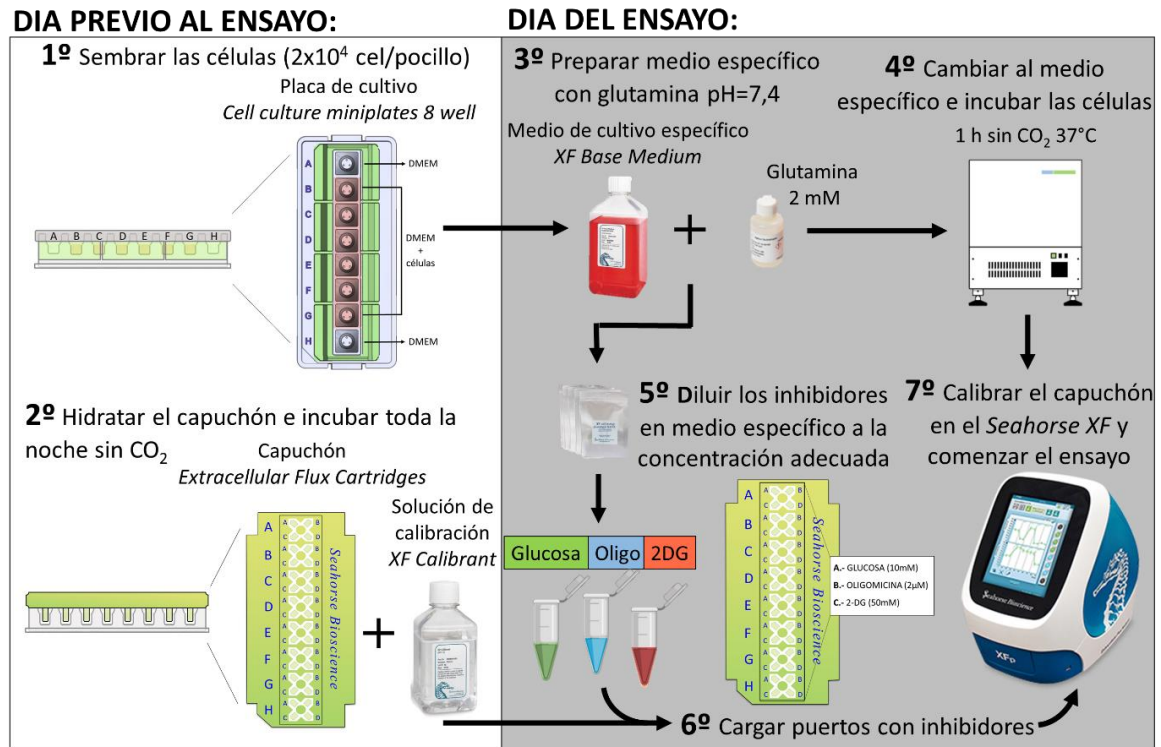


Figura 43 Representación gráfica del flujo de trabajo seguido en la realización del ensayo de medición de la tasa de acidificación extracelular (ECAR).

- **Puerto A;** Glucosa a una concentración de 10 mM: necesaria para el inicio de la ruta de la glucólisis donde finalmente será catabolizada hasta piruvato dando lugar a la producción de ATP, NADH, H_2O y H^+ , acidificando rápidamente el medio extracelular y provocando un incremento de la ECAR.
- **Puerto B;** Oligo a una concentración de 2 μM : inhibidor de la enzima ATP sintasa mitocondrial y, por lo tanto, del acoplamiento entre la CTE y la fosforilación oxidativa afectando a la respiración celular. La inhibición de este proceso logra que la producción de energía sea solamente debida a la glucólisis y produce un aumento de la ECAR.
- **Puerto C;** 2-DeoxiGlucosa (2-DG) a una concentración de 50 μM : análogo de la glucosa que compite por el lugar de ésta uniéndose a la hexoquinasa (primera enzima de la vía glucolítica), de manera que inhibe el inicio de la glucólisis disminuyendo la acidificación del medio y, por tanto, la ECAR.

Objetivo 4

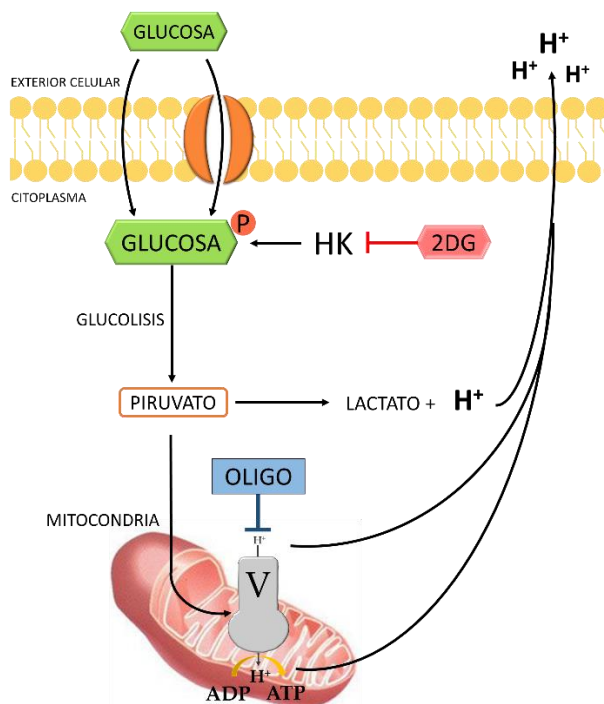


Figura 44 Representación gráfica de como los inhibidores modulan la *ECAR* mediante el aumento o disminución de H^+ . 2-DG: 2-deoxiglucosa. Oligo: oligomicina. H^+ : protón.

La medición de la *ECAR* se realiza obteniendo entre 15 y 20 valores independientes (Figura 45). A partir de los valores obtenidos, se calculan los siguientes parámetros mediante la aplicación de las ecuaciones recogidas en la Tabla 18:

Tabla 18 Ecuaciones utilizadas para obtener los parámetros relacionados con la glucólisis.

<i>Glycolysis Stress Test Kit</i>	
<i>PARÁMETRO</i>	<i>ECUACIÓN</i>
Acidificación no-glucolítica	tasa de <i>ECAR</i> mínima después de inyectar 2-DG
Glucólisis	(tasa de <i>ECAR</i> máxima antes de inyectar Oligo) - (última medida antes de inyectar glucosa)
Capacidad glucolítica	(tasa máxima después de inyectar Oligo) - (última medida antes de inyectar glucosa)
Reserva glucolítica	(capacidad glucolítica) - (glucólisis)

- **Glucólisis:** es el proceso de convertir la glucosa en piruvato. En este caso, este parámetro es medido cuando la *ECAR* alcanza la saturación tras la adicción de glucosa en el medio.

Objetivo 4

- **Capacidad glucolítica:** es el valor obtenido tras la adición de la Oligo donde la función mitocondrial se inhibe y la célula se ve forzada a obtener toda su energía a través del proceso glucolítico.
- **Reserva glucolítica:** es un valor que demuestra la capacidad que tiene la célula de responder en condiciones de estrés donde se presenta una demanda energética elevada.
- **Acidificación NO-glucolítica:** es un valor obtenido tras la inyección de 2-DG que inhibe por completo la glucolisis y revela el valor de *ECAR* que se debe a otras rutas metabólicas no glucolíticas.

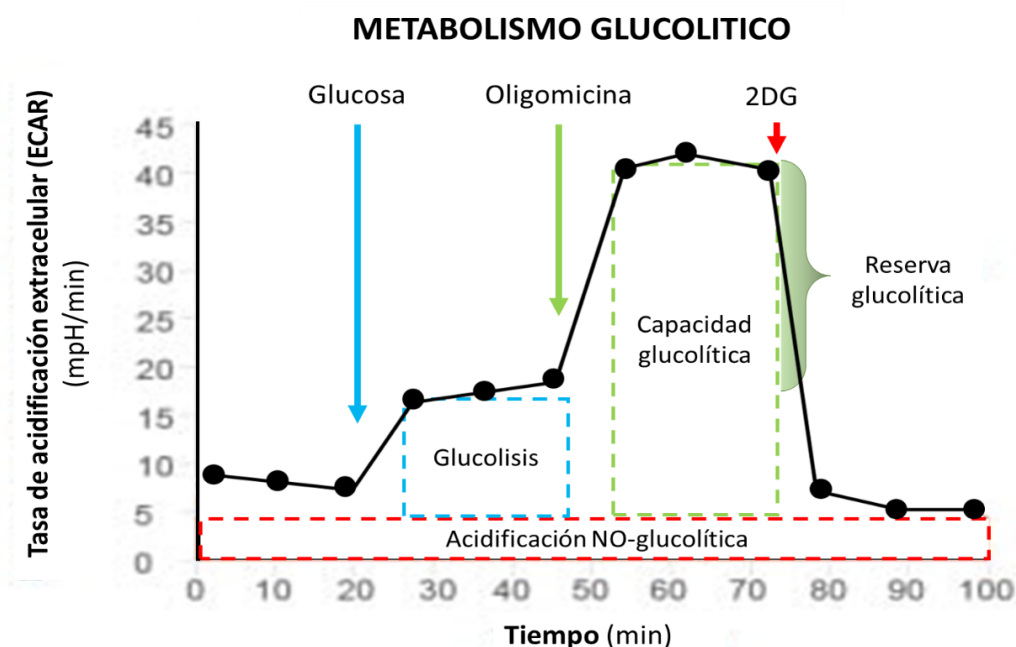


Figura 45 Medición a tiempo real de *ECAR* tras la inyección, de glucosa, Oligo y 2-DG con el fin de calcular los diferentes parámetros: glucolisis, capacidad glucolítica, reserva glucolítica y acidificación no-glucolítica. 2-DG: 2-deoxy glucosa. mpH: unidades de mili pH. min: minutos.

Cada una de las condiciones testadas se estudiaron por triplicado (replica técnica) y cada experimento se llevó a cabo tres veces. El análisis de todos los datos obtenidos se realizó utilizando el *software Wave* y se representaron como un promedio de 3 medidas ($\text{media} \pm \text{DE}$).

Objetivo 4

1.2 Determinación de la producción de ATP

Con los valores obtenidos tras aplicar la metodología para el estudio de *ECAR* se estimó la producción de ATP en los híbridos a través de la glucólisis.

Para la estimación de la producción de ATP originada a partir de la glucólisis, se convirtió el *ECAR* a tasa de producción de protones (*proton production rate- PPR*) y se calculó según lo descrito por Wu y colaboradores (161). Cuando la glucólisis se presenta en estado estacionario, la estequiometría entre la *PPR* y ATP es 1, por lo que con esta constante se cuantificó la producción de ATP mediante el metabolismo glucolítico de los híbridos.

2.- Bioquímica celular: consumo de glucosa, producción de lactato y actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

Para llevar a cabo la determinación de estos parámetros se sembraron 8×10^4 células por pocillo en *DMEM* 4,5+P en MW6 y se incubaron durante 48 h. La determinación de las concentraciones de glucosa y lactato se realizaron en el medio de cultivo utilizando el equipo de análisis bioquímico *A15 BioSystems* a una λ de 500 y 550 nm respectivamente, sustrayendo en todas las condiciones los valores del medio de cultivo incubados bajo las mismas condiciones sin células, expresando los resultados en mg/dl.

2.1 Determinación de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo

La determinación de glucosa se realizó con el kit *Glucose oxidase* (BioSystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente se basa en la generación de un compuesto coloreado que es obtenido por la reacción que transforma la glucosa en ácido glucónico (mediado por la enzima glucosa oxidasa) y H_2O_2 . Este, posteriormente, interactúa con 4-aminoantipirina y fenol, y mediante la acción de

Objetivo 4

la peroxidasa, produce un compuesto coloreado (quinonaimina) y 4 moléculas de H_2O .

2.2 Determinación de la concentración de lactato presente en el medio de cultivo

La determinación del lactato se llevó a cabo con el kit *L- lactate Trinder liquid* (Biochemical Enterprise), siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera breve, se basa en la degradación de L-lactato en piruvato y H_2O_2 , mediado por enzima lactato oxidasa. El H_2O_2 reacciona en presencia de peroxidasa con precursores de cromógeno dando un compuesto de color púrpura. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de ácido láctico presente en la muestra.

2.3 Actividad enzimática de la Lactato Deshidrogenasa (LDH)

La determinación de la actividad enzimática de la LDH se realizó teniendo en cuenta que esta enzima cataliza una reacción bidireccional del piruvato a ácido láctico y viceversa.

Se sembraron 1×10^5 células en *DMEM* 4,5+P MW-6. Tras 24 h, periodo necesario para que las células se expandieran en el fondo de la placa, se lavaron y se cambiaron los medios, incubando las células durante 48 h en *DMEM* 4,5 +P o *DMEM* 1 +P. Tras este tiempo, las células se recogieron y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. El agregado celular se resuspendió y se disgregó mecánicamente utilizando un homogeneizador físico (ultraturrax) en 700 μ l de tampón de lisis fosfato (Tris-HCl) (50 mM, Ácido tetraacético etilenglicol (EGTA) 1 mM, EDTA 1 mM, Tritón-X 100 1%, Ortovanadato de sodio 1 mM, Fluoruro de sodio 50 mM, Pirofosfato de sodio 5 mM y Sucrosa 0,25 mM (Sigma-Aldrich)). El lisado se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min a 4°C para eliminar los restos celulares, se recuperó el sobrenadante y se congeló a -80°C inmediatamente para evitar la degradación enzimática.

Objetivo 4

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo a través de un lector de placas *Tecan Sunrise™* (*Endosafe® Charles River*) en placas MW-96 de fondo plano (Thermo Fisher). Se cargaron 20 μl de muestra por triplicado a lo que se añadió piruvato sódico a 1 mM y NADH a 0,15 mM (Sigma-Aldrich). Para cada una de las muestras se realizó un control de la reacción formado por 20 μl de muestra, 250 μl de NADH y 30 μl H₂O en vez de piruvato, de tal manera que la reacción no puede tener lugar debido a que falta el sustrato de la enzima.

La medida de la actividad enzimática de la LDH se realizó haciendo lecturas de densidad óptica/minuto (DO/min) a 37°C a una λ de 340 nm. En este caso, al añadir como sustrato el piruvato y el NADH, la disminución de la abs será directamente proporcional a la actividad de la LDH (método de Wacker y Amador) (216, 217).

2.4 Determinación de la producción de piruvato celular

La producción de piruvato, molécula obtenida al final de la glucólisis, se midió utilizando el kit *pyruvate assay* (Sigma-Aldrich) mediante una reacción enzimática colorimétrica, cuyo producto final emite a una λ de 570 nm y el valor de abs obtenida es directamente proporcional a la cantidad de piruvato presente en la muestra.

Para ello, se sembraron 1×10^4 células por pocillo en MW-96 durante 48 h en DMEM 4,5+P, DMEM 1+P o en DMEM glu/ole, con el objetivo de evaluar si el porcentaje de este producto metabólico se modificaba por la adición de diferentes sustratos en el medio de cultivo. Siguiendo las instrucciones del fabricante, de manera breve, tras el lisado de las células en *Pyruvate Assay buffer*, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min y, a 50 μl del sobrenadante se añadieron 46 μl de *Assay buffer*, 2 μl de *Pyruvate Probe Solution* y 2 μl de *Pyruvate Enzyme Mix*. Tras 30 min de incubación en oscuridad, la abs de las muestras se midió por duplicado a 570 nm.

Objetivo 4

El valor del fondo de la placa se extrajo a todos los valores obtenidos y la concentración de piruvato se obtuvo extrapolando la abs de la curva patrón incluida en el ensayo. Con ello, a través de la fórmula: S_a/S_v (donde S_a es el valor desconocido extrapolado de la curva patrón (nmol) y S_v es el volumen de muestra añadido a la reacción, 50 μ l) se obtuvo la concentración de piruvato (ng) por μ l de muestra.

3.- Determinación del metabolismo glucolítico mediante sustratos marcados radioactivamente

Los datos obtenidos en este apartado se originaron a partir de dos estancias predoctorales en el *Muscle research group* de la Universidad de Oslo, en el departamento de *Pharmaceutical Biosciences* de la Facultad de Farmacia y se publicaron en la revista *Cells* (Anexo III).

El análisis del metabolismo de la glucosa a nivel basal se llevó a cabo mediante el empleo de sustratos marcados radioactivamente, siguiendo el protocolo descrito por Wensaas y colaboradores (218).

El ensayo realizado para medir el metabolismo de la glucosa se denomina ensayo de oxidación del sustrato y consiste en analizar la glucosa marcada radioactivamente en cada uno de los diferentes estados de su metabolismo. Para ello, se sembraron 1×10^4 células/pocillo en placas *MW-96 CellBIND*[®] (Corning LifeSciences) en *DMEM* 4,5+P o en *DMEM* 1+P durante 48 h. Tras este periodo, se añadió el sustrato radioactivo D-[¹⁴C(U)]glucosa (0,5 μ Ci/ml, 200 μ M) (PerkinElmer NEN[®]) y se montó la estructura de atrapamiento formada por: la placa de 96 pocillos con las células y el medio radioactivo, una silicona separadora y el filtro de 96 pocillos *UniFilter*[®] (PerkinElmer) previamente activado con hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración de 1 M, donde el CO₂ radioactivo producido por el metabolismo celular quedará atrapado tras una incubación de

Objetivo 4

4 h. Las células se lavaron y se lisaron en 0,1 M de NaOH para medir la cantidad total de proteína mediante el kit Bio-Rad *protein assay* en un lector de placas VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer), del mismo modo que se describió en el Objetivo 3 en el apartado 3.1. (Figura 46).

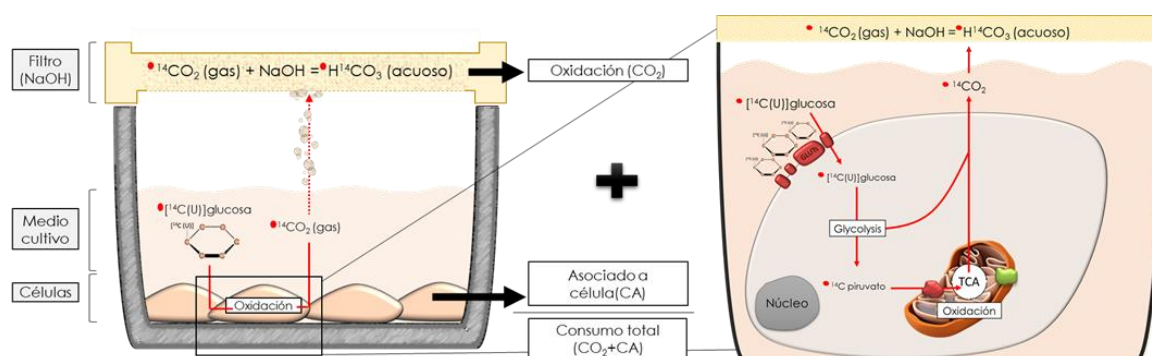


Figura 46 Representación esquemática del metabolismo de la glucosa marcada radioactivamente y parámetros evaluados.

La cantidad de CO₂ atrapado en el filtro, producido en la respiración celular representando la cantidad de sustrato que se ha metabolizado (CO₂), así como, la radioactividad asociada a las células (CA) correspondiente a la cantidad de sustrato que presentan en el interior las células, se midieron añadiendo *scintillation fluid* (Ultima Gold XR, PerkinElmer) tanto en el propio filtro como en el extracto celular y ambos se cuantificaron con 2450 *MicroBeta*² *scintillation counter* (PerkinElmer).

Cada una de las condiciones se realizó por cuatriplicado en el mismo ensayo y cada experimento se realizó por triplicado. Todos los datos obtenidos se normalizaron frente a la cantidad de proteína y, a partir del conjunto de datos obtenidos (CO₂ y CA), se calcularon los siguientes parámetros:

- **Consumo total:** suma del CO₂ y del CA obtenidos (CO₂+CA) parámetro que refleja la cantidad total de radioactividad que ha pasado por las células representándose el total del sustrato metabolizado.

Objetivo 4

- **Fracción oxidativa:** división del valor de oxidación entre el consumo total ($\text{CO}_2/(\text{CO}_2+\text{CA})$). Este parámetro muestra, del total de sustrato que se ha consumido, cuanto sustrato se ha oxidado en función de los parámetros de CO_2 y CA.

4.- Estudio comparativo del metabolismo de la glucosa y el de los ácidos grasos mediante sustratos marcados radioactivamente

4.1 Estudio de la viabilidad celular en presencia de dos inhibidores de transportadores mitocondriales

Con el objetivo de definir la concentración y tiempo de incubación óptimos que no afectase a la viabilidad celular de los inhibidores de los transportadores mitocondriales *mitochondrial pyruvate carrier 2 (MPC2)* y de *CPT1b*, UK5099 y etomoxir (Sigma-Aldrich), respectivamente, se llevó a cabo un análisis de la viabilidad celular.

Además, ya que el vehículo indicado para solubilizar el UK5099 es el DMSO, también se evaluó la viabilidad de las células en presencia de este compuesto para descartar su efecto en el análisis del UK5099.

Para ello, se sembraron 1×10^4 células en MW-96 en DMEM glu/ole durante 24 h para permitir la expansión de las células. Tras este periodo, el SBF se deplecionó hasta el 0,5% para evitar interferencias entre este compuesto y los inhibidores. Después de 24 h, se incubó con los inhibidores durante un periodo de 4 y 24 h en diferentes concentraciones. Así, para el etomoxir se evaluaron las concentraciones de 5, 10, 20 y 40 μM y para el UK5099 se evaluaron las concentraciones de 2, 5, 10, 15 y 20 μM y el DMSO a los volúmenes correspondientes. Una vez transcurrido este tiempo, se analizó la viabilidad celular con el kit *CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se prepara una mezcla de 2 ml de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-

Objetivo 4

carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS), que se reducirá dando lugar a la formación de formazán, y 100 μl de fenazino metosulfato (PMS) por cada MW-96 añadiendo 20 μl de la mezcla por cada pocillo de muestra. Se incubó durante 2 h a 37°C y se leyó en un lector de placas NanoQuant a una $\lambda=490$ nm.

4.2 Estudio del metabolismo glucolítico y lipídico a nivel basal

Para analizar el metabolismo de la glucosa y del ácido oleico a nivel basal se realizaron dos ensayos diferentes empleando sustratos marcados radioactivamente.

Ensayo de oxidación de sustrato

Se cultivaron 1×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos *CellBIND*[®] (Corning LifeSciences) en *DMEM* 1+P o en *DMEM* ole durante 48 h. A continuación, se eliminó el medio de cultivo, se añadieron los sustratos radioactivos D-[¹⁴C(U)]glucosa (0,5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 200 μM) o [1-¹⁴C]ácido oleico (0,5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 100 μM) (PerkinElmer NEN[®]) y se montó la estructura de atrapamiento descrita anteriormente (Figura 47). Al terminar el tiempo de atrapamiento, el medio de cultivo con [1-¹⁴C]ácido oleico se transfirió a una nueva placa multipocillo y se congeló a -20°C.

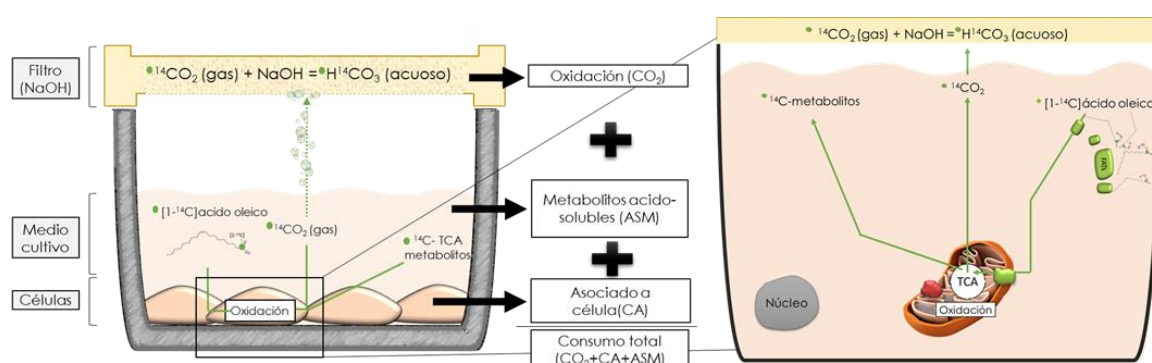


Figura 47 Representación esquemática del análisis del metabolismo del ácido oleico marcado radioactivamente y los parámetros evaluados.

Objetivo 4

La cantidad de CO₂ atrapado en el filtro y la radioactividad asociada a las células (CA) se midió añadiendo *scintillation fluid* (Ultima Gold XR, PerkinElmer) y se cuantificó con *2450 MicroBeta² scintillation counter* (PerkinElmer). La cuantificación de los metabolitos ácido-solubles (ASM) es un parámetro que refleja la oxidación incompleta de los ácidos grasos donde se mide principalmente metabolitos originados en el TCA y acetil-ésteres, y se realizó siguiendo la metodología descrita por Skrede y colaboradores (219). Brevemente, se precipitaron 100 µl del medio recuperado con [1-¹⁴C]ácido oleico, después de las 4 h de atrapamiento, con 300 µl de HClO₄ frío a 1 M y 30 µl BSA al 6%. Se centrifugaron los tubos a 10000 rpm durante 10 min a 4°C, se mezclaron 200 µl del sobrenadante con 3 mL de *Optiphase Supermix scintillation fluid* y se cuantificó la radioactividad en el soporte físico Packard TriCarb 1900 TR (PerkinElmer).

De nuevo, cada una de las condiciones se realizó por cuatriplicado en el mismo ensayo y cada experimento se realizó por triplicado. Todos los datos obtenidos se normalizaron frente a la cantidad de proteína y, a partir del conjunto de datos obtenidos (CO₂, CA y ASM), se calcularon los siguientes parámetros:

- **Consumo total:** suma de CO₂, CA y ASM.
- **Fracción oxidativa:** $CO_2 / (CO_2 + CA + ASM)$.
- **Eficiencia de la β-oxidación ácido oleico:** (ASM / CO_2) descrito por Bell y colaboradores, consiste en evaluar la eficiencia de la oxidación de ácidos grasos teniendo en cuenta los intermediarios generados, ya que no todos los carbonos de estas moléculas se incorporan al TCA (220).

Ensayo de incorporación del sustrato

Con el objetivo de complementar los datos obtenidos a nivel basal, se realizó un ensayo que nos permitió ver la incorporación de la glucosa y del ácido oleico con el paso del tiempo.

Objetivo 4

Para ello, se sembraron 1×10^4 células/pocillo en placas de cultivo de MW-96 *Cytostar-T*[®] 96-well *scintillation microplate* o 96-*Scintiplate*[®] (PerkinElmer) con DMEM 1+P o con DMEM ole durante 24 h. A continuación, se midió la incorporación al interior celular de los sustratos marcados radioactivamente (D-[¹⁴C(U)]glucosa (0,5 μ Ci/ml) o [1-¹⁴C]ácido oleico (100 μ M, 0,5 μ Ci/ml)) a las 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h en el 2450 *MicroBeta*² *scintillation counter* (PerkinElmer) como describió previamente Wensaas y colaboradores (218). De esta manera, a medida que las células incorporaban el sustrato a su interior, la intensidad de señal radioactiva crecía de una manera directamente proporcional. Tras la medición de las 24 h, las células se lavaron y se levantaron con NaOH 0,1 M y el contenido en proteína de los lisados se midió con el kit de Bio-Rad utilizando un lector de placas VICTOR[™] X4 *Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer).

4.3 Estudio de la competición entre el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos y la flexibilidad metabólica

Para estudiar la competición entre ambos metabolismos, se llevaron a cabo dos tipos de aproximaciones diferentes partiendo de la metodología explicada anteriormente (ensayo de oxidación de sustrato).

El primer protocolo se realizó para estudiar el efecto del ácido oleico en el metabolismo de la glucosa. Para ello, se sembraron 1×10^4 células/pocillo en placas MW-96 *CellBIND*[®] (Corning LifeSciences) en DMEM 1+P (basal) o en DMEM glu/ole durante 48 h. A continuación, se lavaron y se incubaron en presencia de D-[¹⁴C(U)]glucosa (0,5 μ Ci/ml, 200 μ M) durante 4 h de atrapamiento. Finalmente, se siguió con el protocolo descrito anteriormente y se midieron y calcularon los diferentes parámetros de radioactividad (Figura 48).

Objetivo 4

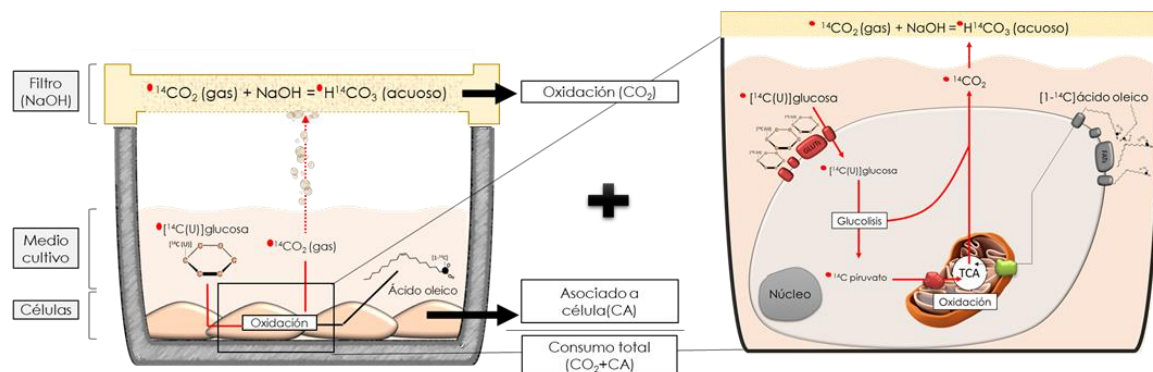


Figura 48 Representación esquemática del metabolismo de la glucosa marcada radioactivamente (rojo) en presencia de ácido oleico (gris, ya que en este experimento no está marcado radioactivamente), así como de los parámetros evaluados.

El segundo protocolo se llevó a cabo mediante el empleo de dos inhibidores específicos de las rutas de la glucólisis y de oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial, UK5099 y etomoxir, respectivamente. El etomoxir inhibe la oxidación de los ácidos grasos, ya que bloquea el transportador de ácidos grasos *CPT1b* al interior mitocondrial, mientras que el UK5099 es un inhibidor del transportador de piruvato *MPC2* al interior mitocondrial (221-223).

Para ello, se sembraron las células en el mismo soporte y se cultivaron durante 30 h en DMEM glu/ole suplementado con 10% de SBF. A continuación, se disminuyó el SBF hasta el 0,5% y se mantuvo durante 18 h más. Tras las 48 h de crecimiento, se realizó el atrapamiento durante 4 h incubando las células en presencia de D- $^{14}\text{C(U)}$ glucosa (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 200 μM) (condición basal), D- $^{14}\text{C(U)}$ glucosa con 10 μM etomoxir (Sigma-Aldrich) (ruta ácidos grasos bloqueada), ^{14}C ácido oleico (100 μM , 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$) (condición basal) o ^{14}C ácido oleico con 20 μM aciano-h-(1-phenylindol-3-yl)-acrilato (UK5099) (Sigma-Aldrich) (ruta glucólisis bloqueada). Finalmente, se procedió con el resto del ensayo y se calcularon los parámetros asociados descritos anteriormente (Figura 49).

Objetivo 4

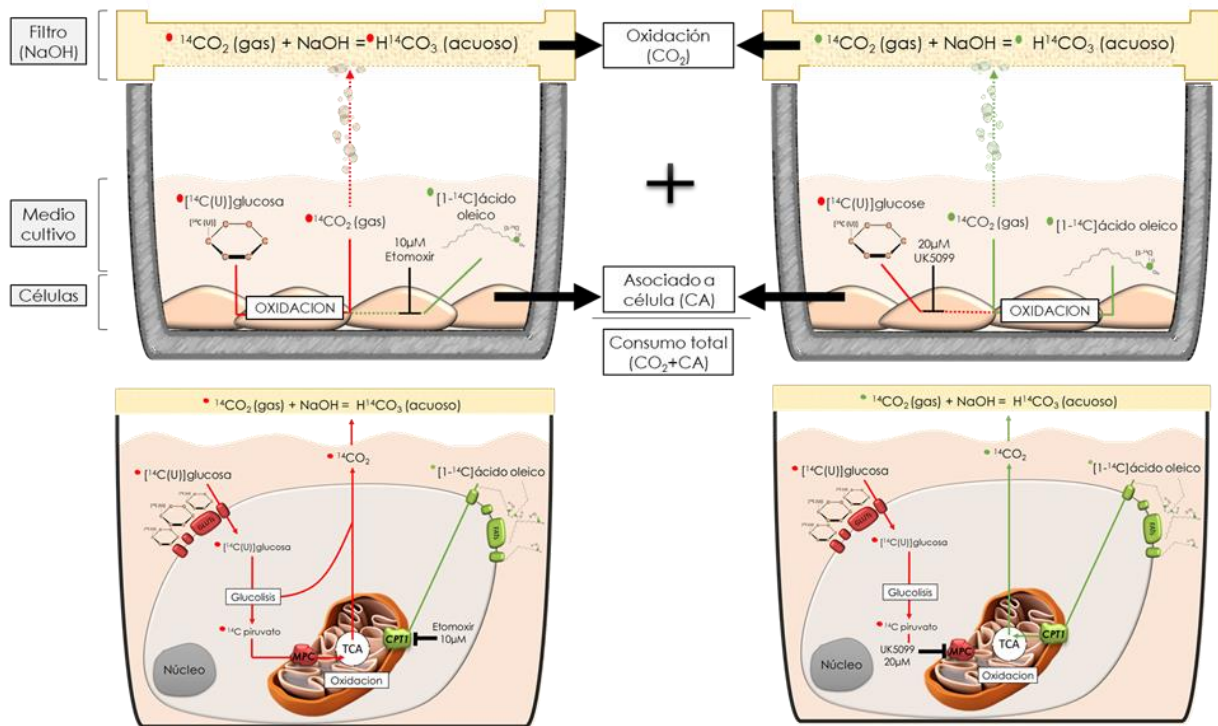


Figura 49 Representación esquemática del metabolismo de la glucosa (rojo) y del ácido oleico (verde) al estudiar la flexibilidad metabólica en presencia de inhibidores mitocondriales. Etomoxir: inhibidor de CPT1b. UK5099: inhibidor de MPC2. Así como de los parámetros evaluados.

5.- Análisis del almacenamiento celular de los principales sustratos metabólicos: glucosa y ácidos grasos

5.1 Determinación del almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno y otras glucoproteínas: Tinción de PAS (Ácido periódico-Schiff)

La determinación de la glucosa en el interior celular se llevó a cabo mediante la tinción de ácido periódico y reactivo de Schiff. La base de esta técnica reside en que, la oxidación de los enlaces -OH por el ácido periódico genera grupos aldehído, que son reconocidos y teñidos por el reactivo de Schiff generando un color fucsia.

En la puesta a punto del protocolo de tinción PAS se utilizaron las células Hep G2 como control positivo ya que, al ser células hepáticas, acumulan glucógeno en su interior. Así, se cultivaron 5×10^4 células en cubreobjetos de cristal en MW-12

Objetivo 4

(Corning) en *DMEM* 4,5+P, *DMEM* 1+P o *DMEM* glu/ole durante 48 h. Posteriormente, las células se lavaron y fijaron en 10% de formaldehído (Sigma-Aldrich) durante 7 min a TA. A continuación, las células fijadas se incubaron con 0,5% de ácido periódico (Sigma-Aldrich) durante 5 min y seguidamente durante 20 min con reactivo de *Schiff* (Sigma-Aldrich) en oscuridad. Finalmente, como método de contraste y tinción nuclear, se utilizó la hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) durante 3 min. El montaje de las preparaciones se realizó con *Dako Glicergel Mounting Medium* (Agilent).

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Olympus (Olympus Life Sciences). El análisis de las fotografías se realizó mediante el software Fiji (224) teniendo en cuenta 3 campos diferentes a un aumento de 20X de cada una de las muestras estudiadas.

5.2 Análisis de la incorporación y distribución del ácido oleico: Técnica de cromatografía en capa fina

La cuantificación de la distribución lipídica se hizo mediante cromatografía en capa fina basado en las propiedades migratorias de un líquido en una superficie porosa.

Este experimento se realizó sembrando un total de $1,5 \times 10^5$ células/pocillo en placas multipocillo (MW-12) *Corning® CellBIND®* (Corning) durante 24 h en *DMEM* 4,5+P y otras 24 h más en $[1-^{14}\text{C}]$ ácido oleico (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$) a una concentración de 100 μM . A continuación, las células se lavaron dos veces y se levantaron con 0,1% de *SDS*. Siguiendo la metodología descrita por Gaster y colaboradores (225), las muestras se separaron por fases con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) y, tras obtener la fase superior, se dejó evaporar el cloroformo. A partir de aquí, las muestras se homogeneizaron utilizando un solvente no polar formado por hexano, dietiléter y ácido acético (65:35:1) y se separaron mediante cromatografía en capa fina. Una vez que las muestras corrieron a lo largo de la membrana, las bandas de lípidos se

Objetivo 4

tiñeron en presencia de yodo para poder delimitar la región que ocupaba cada una de ellas. Finalmente, la radiación de cada fragmento se cuantificó tras añadir 3 mL de *Optiphase supermix scintillation* fluid en un Tri-Carb 1900 TR (PerkinElmer). El contenido en proteína se analizó en cada una de las muestras utilizando el kit de *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific) mediante un lector de placas *VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader*.

5.3 Análisis de la acumulación de ácidos grasos en forma de gotas lipídicas (*Lipid droplets- LDs*)

5.3.1 Cuantificación del almacenamiento de ácidos grasos en forma de *LD* mediante citometría de flujo

El análisis del almacenamiento de ácido grasos en el interior celular en forma de gotas lipídicas se midió mediante la intensidad de fluorescencia del 4,4-Difluoro-2,3,5,6-bis-tetrametilen-4-bora-3a,4a-diaza-indaceno (LD540), cedido por el Dr. Thiele del *Life and Medical Sciences Institute* (226). Este fluoróforo lipofílico forma parte de la familia de los colorantes conocidos como *BODIPY* y presenta un alto rendimiento de fluorescencia, lo que mejora el marcaje de los lípidos pudiendo ser detectados por citometría de flujo ya, que emite fluorescencia en el rango del espectro rojo.

Para llevar a cabo este experimento, se sembraron 9×10^4 células por pocillo en *MW-6* con *DMEM* 4,5+P o *DMEM* ole. Siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente (Objetivo 3 en el apartado 2), tras 48 h de incubación, las células se lavaron con solución salina y se incubaron con LD540 a una dilución 1:10000 en *HBSS* durante 30 min en oscuridad. Después del periodo de incubación se procedió con la metodología descrita anteriormente y las células se analizaron mediante citometría de flujo.

Objetivo 4

5.3.2 Tinción de gotas lipídicas mediante el empleo de LD540

El análisis del almacenamiento de ácidos grasos mediante citometría de flujo se complementó con el estudio de imagen tras realizar el siguiente protocolo de tinción de fluorescencia.

En este caso, las células se crecieron en *DMEM* 4,5+P como condición basal y *DMEM* ole durante 48 h. A continuación, las células se lavaron con *PBS* y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 min a TA. Se volvieron a lavar 2 veces con *PBS*, una vez con *PBS* suplementado con Tween20 al 0,1% durante 5 min a TA para llevar a cabo la permeabilización de las células y facilitar la incorporación del fluoróforo. Posteriormente, se añadió el LD540 a una dilución 1:10000 en *PBS* durante 30 min en oscuridad a TA. Se contra tiñó con Hoechst. Tras la incubación se realizaron lavados con *PBS* y uno final con H₂O destilada y se utilizó *ProLong™ Gold Antifade Mountant* (Sigma-Aldrich) como medio de montaje. Las preparaciones se visionaron en el microscopio confocal *Nikon, AR-1*, en el SAI de la Universidad de la Coruña.

5.3.3 Empleo del almacenamiento del ácido oleico en el metabolismo celular: determinación de la lipólisis celular

Con el objetivo de conocer si los híbridos eran capaces de utilizar los reservorios energéticos en forma de gotas lipídicas, se analizó la lipólisis celular, que consiste en la liberación de estos ácidos grasos acumulados para su posterior oxidación vía mitocondria.

Para ello, tras las 24 h del ensayo de incorporación de sustrato en presencia de ácido oleico marcado radioactivamente, las células se lavaron 3 veces con *PBS* y se añadió medio de cultivo nuevo preparado a partir de *PBS* suplementado con 0,5% de *BSA*. A continuación, se midió la lipólisis en el interior celular del [1-¹⁴C]ácido oleico (100 μM, 0,5 μCi/ml) marcado radioactivamente a las 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h en el

Objetivo 4

2450 *MicroBeta² scintillation counter* (PerkinElmer), como describió previamente Wensaas y colaboradores (218). De esta manera, a medida que las células consumen los reservorios de este sustrato (debido a que no presentan otro nutriente en el medio de cultivo), la intensidad de la señal radioactiva disminuía de manera directamente proporcional. Una vez finalizado el ensayo, las células se lavaron con *PBS* y se levantaron con *NaOH* 0,1 M y el contenido en proteína de los lisados se midió con el kit de Bio-Rad utilizando un lector de placas *VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer).

6.- Expresión génica de enzimas implicadas en el metabolismo glucolítico y lipídico

Del mismo modo que se describió en la metodología del Objetivo 2 en el apartado 7, el análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante *RT-PCR* en *LightCycler® 480 II* utilizando sondas *Taqman® UPL Probe*.

Todos los genes y cebadores utilizados en el desarrollo de este objetivo se recogen en la Tabla 9.

7.- Análisis estadístico

Los valores obtenidos en el desarrollo de este objetivo se representaron como la media \pm DE de 3 experimentos independientes, a excepción de aquellos casos en los que los resultados se representaron como la media \pm error estándar (SEM), información que aparecerá reflejada en cada caso en el pie de figura. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete informático *GraphPad Prism* versión 6.01 (GraphPad), aquellos realizados en cada caso se detallan en la Tabla 19.

En caso de que se emplee otro tipo de análisis estadístico, la metodología utilizada se detallará en cada uno de los apartados correspondientes. Los valores analizados

Objetivo 4

con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Tabla 19 Análisis estadísticos utilizados en cada una de las comparaciones llevadas a cabo en este objetivo.

<i>ANÁLISIS</i>	<i>SÍMBOLO</i>	<i>TEST</i>
<i>N vs OA</i>	*	<i>t test no-pareado (t de Student)</i>
<i>+P vs -P</i>	\$	<i>t test no-pareado (t de Student)</i>
<i>glu vs ole</i>	a	<i>t test no-pareado (t de Student)</i>
<i>DMEM 4,5 vs 1</i>	b	<i>t test pareado (t de Student)</i>
<i>basal vs condición</i>	#	<i>test no-paramétrico de Mann-Whitney</i>

N: normal. OA: artrósico. +P: con piruvato. -P: sin piruvato. Glu: glucosa. Ole: oleico.

Objetivo 4

1.- Estudio de la glucolisis mediante el análisis de la tasa de acidificación extracelular (*ECAR*)

1.1 Determinación de la capacidad glucolítica a través de la tasa de acidificación extracelular (*ECAR*)

La determinación de la capacidad glucolítica de los cíbridos se realizó mediante el análisis de la modulación de la *ECAR* debido a la inyección de diferentes compuestos que modulan esta ruta.

Así, como aparece reflejado en la Figura 50 a, la *ECAR* se vio incrementada tras la adicción de la glucosa, permitiéndonos analizar el parámetro de glucolisis. Posteriormente, se añadió la Oligo que, al inhibir el complejo V y, por tanto, la generación de ATP vía mitocondrial, se produce la acumulación de H⁺ que finalmente salen al medio extracelular y elevan el parámetro de *ECAR* y permitiéndonos calcular la capacidad glucolítica que presentan las células. Finalmente se inyectó la 2-DG que es un análogo de la glucosa. Este compuesto compite con la glucosa por la hexoquinasa 2 (*HK2*) que tras fosforilar la 2-DG, se inhibe la ruta de la glucolisis, lo que proporciona el valor de *ECAR* no debida a la glucolisis (que se resta a la hora de realizar los cálculos) y permite calcular el parámetro de reserva glucolítica.

El análisis de los datos reflejó que los cíbridos OA son menos glucolíticos que los N, ya que mostraron el parámetro de glucolisis disminuido en referencia a este grupo (OA 75,91±8,24 vs N 85,43±11,18 p≤0,05), no obstante, no se observaron diferencias en el resto de parámetros analizados ni entre los haplogrupos de ADNmt (Figura 50 b y c).

Objetivo 4

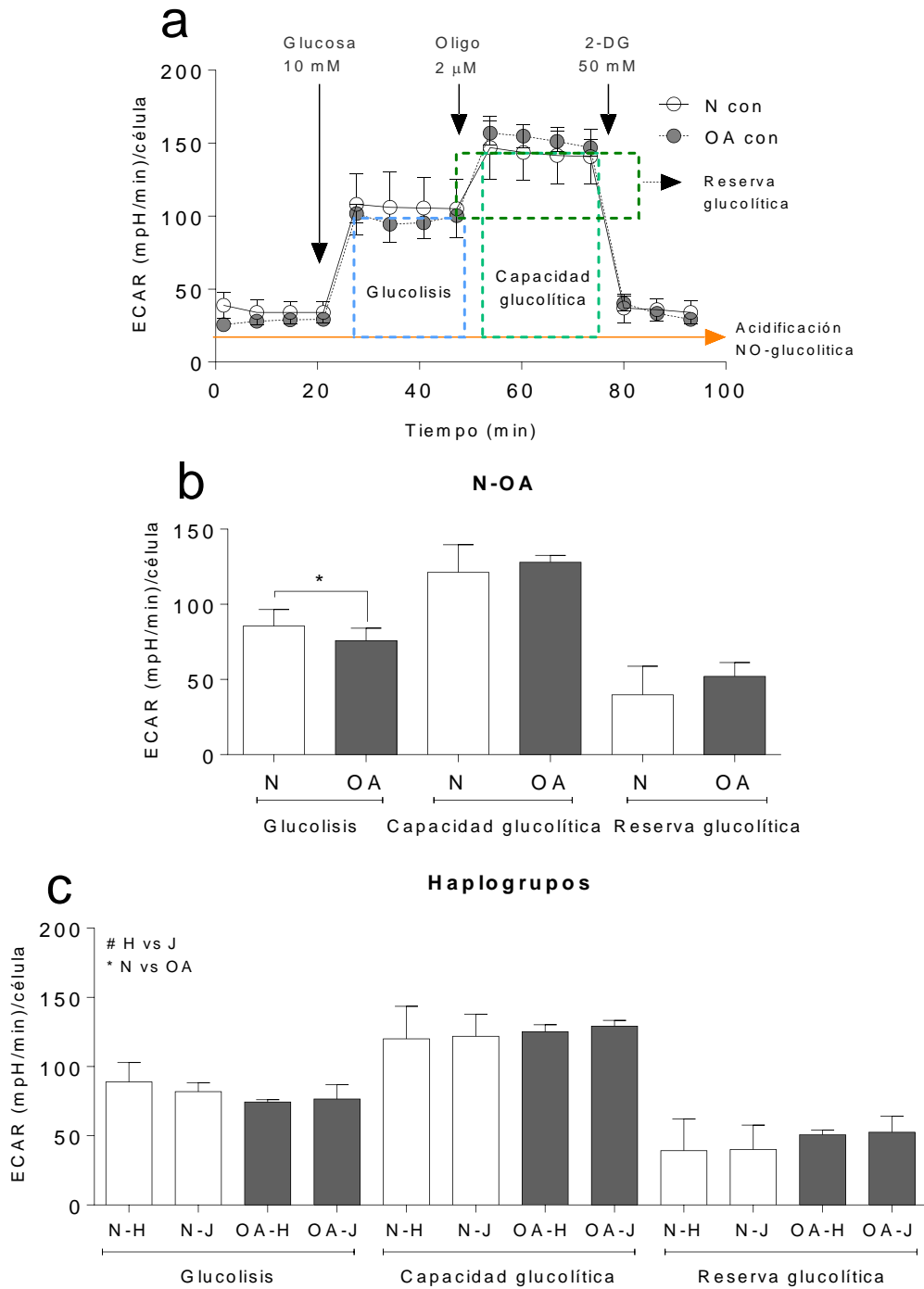


Figura 50 Determinación de la capacidad glucolítica de los híbridos. **(a)** Representación de la modulación de la *ECAR* tras la adición seriada de los inhibidores correspondientes. **(b)** Análisis de los parámetros obtenidos entre N y OA. **(c)** Análisis de los parámetros obtenidos entre haplogrupos de ADNmt. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ híbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J. *ECAR*: tasa de acidificación extracelular. Oligo: oligomicina. 2-DG: 2-deoxiglucosa. mpH: unidades mili pH. Min: minutos

Objetivo 4

1.2 Determinación de la producción de ATP

El análisis de la determinación de ATP debida a la glucólisis no reflejó diferencias entre los cíbridos N y OA (Figura 51 a). Sin embargo, a la hora de realizar el análisis en función de los haplogrupos de ADNmt, se observó que los cíbridos OA-J presentaban un incremento de la producción de energía tanto en referencia a los cíbridos OA-H como a los cíbridos N-J (OA-J $165,40 \pm 26,37$ vs OA-H $128,50 \pm 38,47$ $p \leq 0,05$, vs N-J $142,50 \pm 12,81$ $p \leq 0,05$) (Figura 51 b).

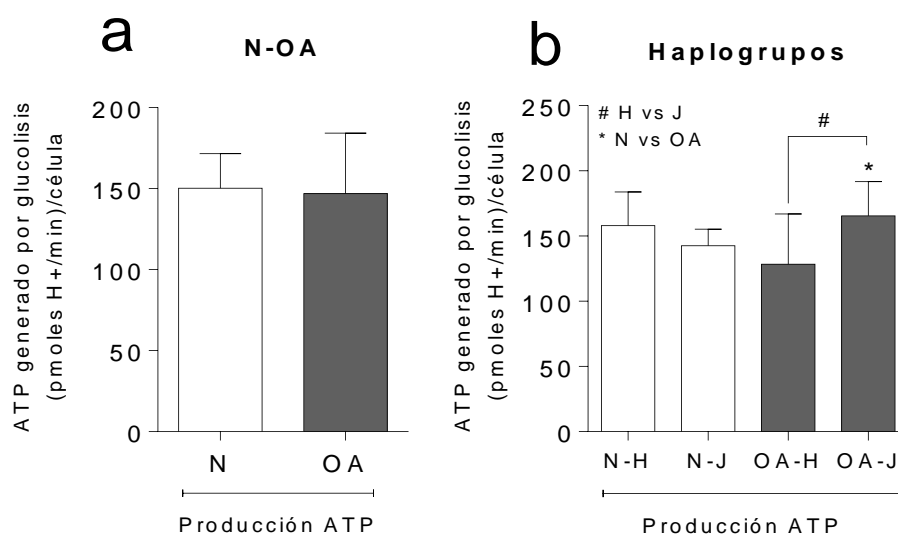


Figura 51 Determinación de la producción de ATP asociado a la ECAR de los cíbridos. **(a)** Análisis de los parámetros obtenidos entre N y OA. **(b)** Análisis de los parámetros obtenidos entre haplogrupos de ADNmt. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ cíbridos N y OA. # $p \leq 0,05$ haplogrupos de ADNmt H y J. ECAR: tasa de acidificación extracelular.

2.- Bioquímica celular: consumo de glucosa, producción de lactato y actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

2.1 Determinación de la concentración de glucosa y de lactato presente en el medio de cultivo

Los niveles de glucosa en el medio de cultivo se midieron tras 48 h de crecimiento celular y los valores obtenidos se consideraron una estimación directa del consumo

Objetivo 4

de glucosa por parte de las células. Del mismo modo, se analizaron los niveles de lactato en el medio de cultivo, considerándose una estimación de la producción de este compuesto.

Los datos obtenidos reflejaron que los híbridos OA presentan un mayor consumo de glucosa que los N, sin observarse diferencias significativas entre los haplogrupos de ADNmt H y J (**OA** $43,77 \pm 8,87$ vs **N** $31,91 \pm 13,69$ $p \leq 0,05$) (Figura 52 a y b). Por su parte, los valores de la producción de lactato no mostraron diferencias entre los híbridos N y OA, pero sí que se observó que los híbridos portadores del haplogrupo de ADNmt J produjeron mayor cantidad de lactato que aquellos portadores del haplogrupo de ADNmt H (**N-J** $64,22 \pm 10,77$ vs **N-H** $51,43 \pm 6,85$ $p \leq 0,05$; **OA-J** $63,81 \pm 9,68$ vs **OA-H** $45,48 \pm 2,99$ $p \leq 0,0001$) (Figura 52 c y d).

Una vez obtenidos estos dos datos, se analizó el ratio entre ambos parámetros (lactato/glucosa) con el objetivo de observar cuanto lactato es producido en base al consumo de glucosa. El análisis reveló que los híbridos OA presentan un ratio menor que los N, revelando que no toda la glucosa consumida se transforma en lactato e indicando que quizás este mayor consumo se deba a un mayor requerimiento mitocondrial (**OA** $1,41 \pm 0,50$ vs **N** $2,27 \pm 1,20$). No se observaron diferencias entre los haplogrupos de ADNmt al evaluar este parámetro (Figura 52 e y f).

Objetivo 4

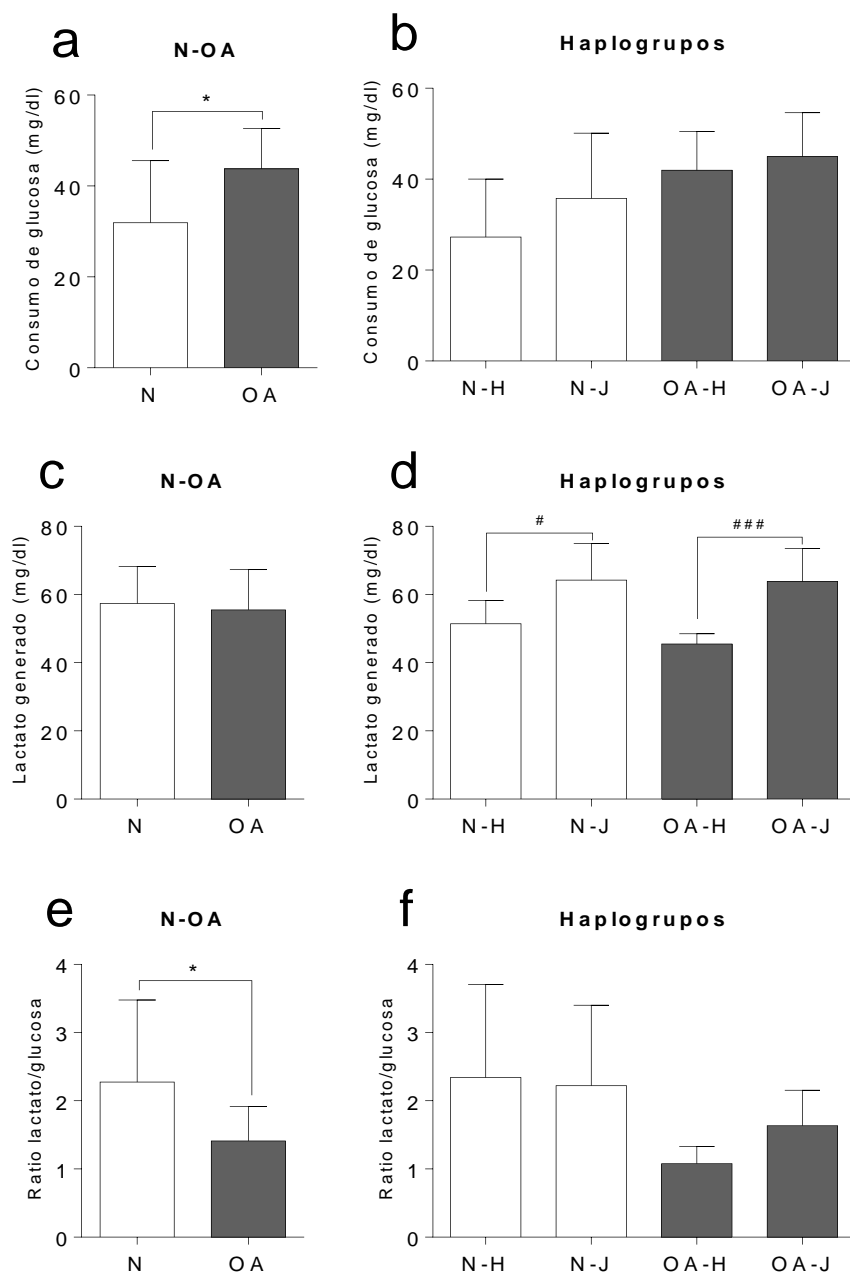


Figura 52 Consumo de glucosa y producción de lactato en cíbridos. **(a-b)** Consumo de glucosa. **(c-d)** Producción de ácido láctico. **(e-f)** Ratio entre la producción de lactato y el consumo de glucosa. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ cíbridos N y OA. # $p \leq 0,05$, ### $p \leq 0,0001$ haplogrupos de ADNmt H y J.

2.2 Actividad enzimática de la Lactato Deshidrogenasa (LDH)

La actividad de la enzima LDH se midió a través de la reacción que cataliza la propia enzima, aislada a partir de los extractos celulares, en presencia de piruvato

Objetivo 4

y NADH por lo que, a mayor cantidad de enzima, más rápido desaparece el sustrato (piruvato).

El análisis de la actividad de la LDH apenas reflejó diferencias entre los cíbridos N y OA cultivados en *DMEM* 4,5+P. Sin embargo, cuando los cíbridos se crecieron en *DMEM* 1+P, la actividad de la LDH se vio disminuida significativamente en los OA (OA $9,735e-009 \pm 5,439e-009$ vs N $1,692e-008 \pm 9,013e-009$ $p \leq 0,05$) (Figura 53 a). A la hora de realizar el análisis en función de los haplogrupos de ADNmt, únicamente la comparación entre N-H y N-J mostró que los cíbridos N-J presentan una mayor actividad de LDH que los N-H crecidos en *DMEM* 4,5 +P (N-J $2,226e-008 \pm 1,554e-008$ vs N-H $7,748e-009 \pm 4,136e-009$ $p \leq 0,05$) (Figura 53 b).

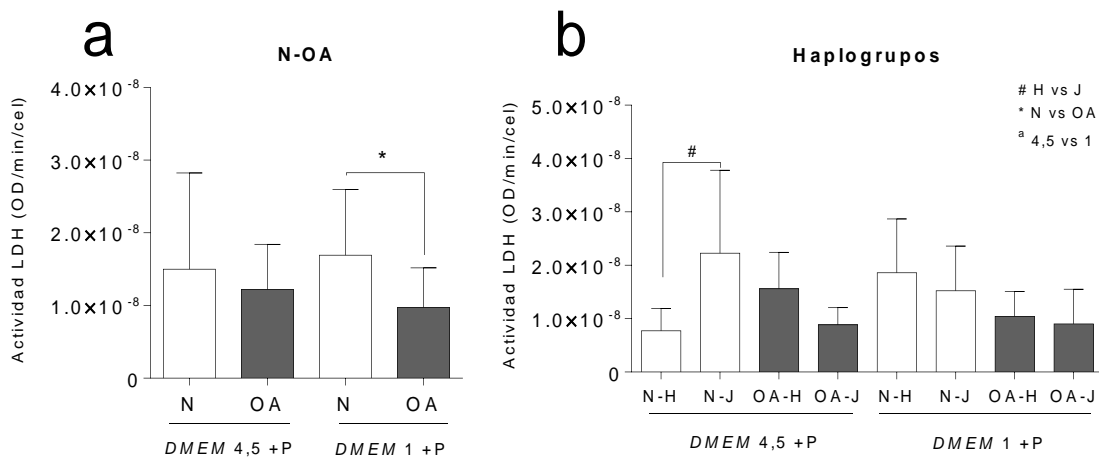


Figura 53 Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cíbridos crecidos en *DMEM* 4,5+P y *DMEM* 1+P. **(a)** Análisis entre cíbridos N y OA. **(b)** Análisis entre haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como media ± DE de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ cíbridos N y OA. # $p \leq 0,05$ haplogrupos de ADNmt H y J. a *DMEM* 4,5 vs 1. +P: con piruvato.

2.3 Determinación de la producción de piruvato celular

La determinación de la producción de piruvato se realizó creciendo las células en presencia de diferentes sustratos nutricionales. Para observar la modulación de este parámetro en función de un metabolismo celular más glucolítico o un metabolismo más competitivo, se combinó la presencia en el medio de cultivo de glucosa (1 gr/L) y ácido oleico (100 μM) (*DMEM* glu/ole).

Objetivo 4

El análisis de los datos obtenidos reveló que la concentración de piruvato en el interior celular no se encuentra modulada por los diferentes sustratos nutricionales empleados. Únicamente se observó una disminución de la concentración de piruvato cuando se cultivaron las células en presencia de glucosa y oleico en los híbridos OA, sin llegar a ser una diferencia estadísticamente significativa (Figura 54 a). A la hora de analizar la expresión génica de *MPC2*, se observó que los híbridos OA presentan niveles de expresión de este gen disminuidos en comparación con los N cuando se crecieron bajo diferentes concentraciones de glucosa (*DMEM 4,5+P OA* $0,77\pm 0,17$ vs *N* $1,34\pm 0,28$ $p\leq 0,0001$; *DMEM 1+P OA* $0,82\pm 0,18$ vs *N* $1,10\pm 0,33$ $p\leq 0,05$) (Figura 54 b).

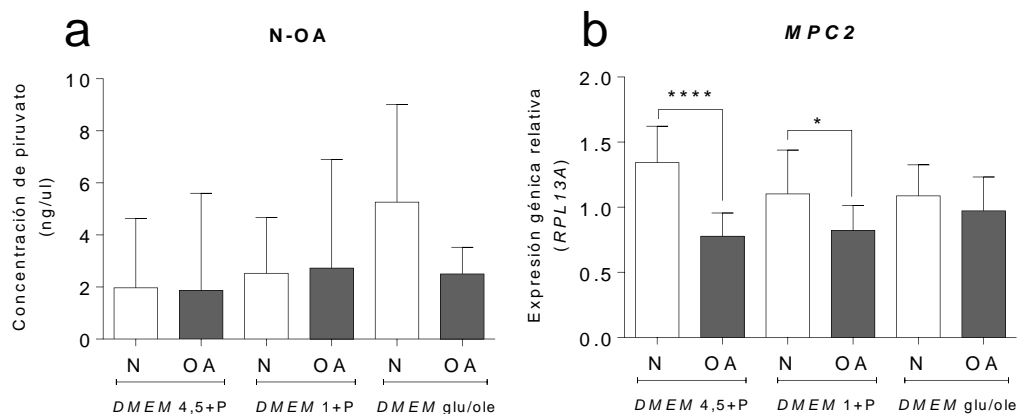


Figura 54 Determinación de la producción de piruvato y de la expresión génica del transportador de piruvato mitocondrial *MPC2*. **(a)** Producción de piruvato en presencia de *DMEM 4,5+P*, *DMEM 1+P* o *DMEM glu/ole*. **(b)** Expresión génica de *MPC2* al crecer las células en presencia de *DMEM 4,5+P*, *DMEM 1+P* o *DMEM glu/ole*. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p\leq 0,05$, **** $p\leq 0,0001$ híbridos N y OA. a *DMEM 1 vs 4,5; vs glu/ole*.

3.- Determinación del metabolismo glucolítico mediante sustratos marcados radioactivamente

La determinación del metabolismo glucolítico se realizó creciendo las células tanto en *DMEM 4,5+P* como en *DMEM 1+P*, analizando los parámetros obtenidos tras el empleo de glucosa marcada radioactivamente durante 4 h de atrapamiento.

Objetivo 4

Al analizar los resultados se observó que, cuando se crecieron las células en una alta concentración de glucosa (*DMEM 4,5+P*), los cíbridos OA presentaron niveles de CO_2 , CA, consumo total y fracción oxidativa más elevados que los N (CO_2 OA $95,73 \pm 12,84$ vs N $54,21 \pm 5,29$ $p \leq 0,05$; CA OA $27,49 \pm 2,15$ vs N $20,08 \pm 2,27$ $p \leq 0,05$; **consumo total** OA $122,30 \pm 12,28$ vs N $73,23 \pm 6,84$ $p \leq 0,01$; **fracción oxidativa** OA $0,77 \pm 0,02$ vs N $0,70 \pm 0,02$ $p \leq 0,05$) (Figura 55 a).

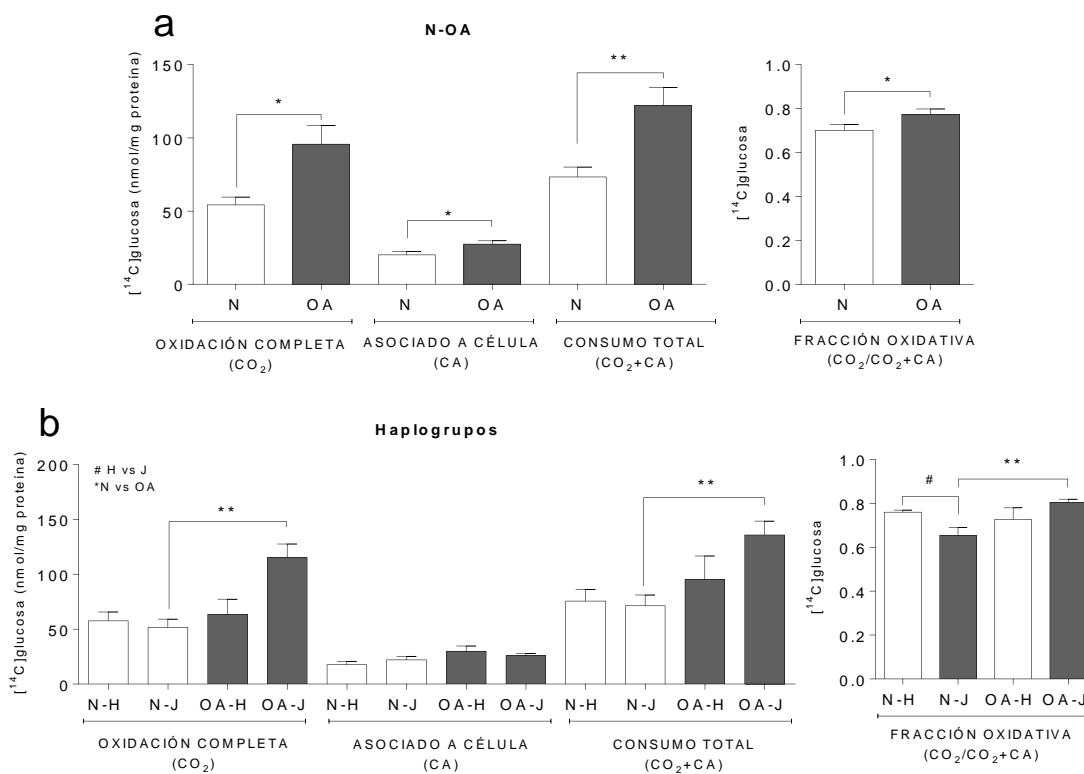


Figura 55 Determinación del metabolismo glucolítico en *DMEM 4,5+P*. **(a)** Parámetros glucolíticos evaluados en cíbridos N y OA. **(b)** Parámetros glucolíticos evaluados haplogrupos de ADNmt. Los datos se representan como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes realizados con 4 réplicas de cada condición y cíbrido. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ cíbridos N y OA. # $p \leq 0,05$ haplogrupos de ADNmt H y J.

El análisis de los datos en función de los haplogrupos de ADNmt reflejó que los cíbridos N-J presentan una fracción oxidativa menor que los N-H (N-J $0,65 \pm 0,03$ vs N-H $0,75 \pm 0,01$ $p \leq 0,05$). Además, el mismo análisis mostró que los cíbridos OA-J producen mayor CO_2 y consumen más glucosa, reflejado en una mayor fracción oxidativa, que los N-J (CO_2 OA-J $115,10 \pm 12,44$ vs N-J $51,57 \pm 7,61$ $p \leq 0,01$; **consumo**

Objetivo 4

total OA-J 135,80±12,70 vs N-J 71,34±9,81 p≤0,01; fracción oxidativa OA-J 0,80±0,01 vs N-J 0,65±0,03 p≤0,01 (Figura 55 b).

Por su parte, no se observaron diferencias en el metabolismo de la glucosa al crecer las células en DMEM 1+P (Figura 56 a), pero, a la hora de analizar los datos obtenidos en función de los haplogrupos de ADNmt, el análisis reflejó que los híbridos OA-J tienden a oxidar (CO₂) y a incorporar (CA) más glucosa que los OA-H (CA OA-J 45,28±3,97 vs OA-H 33,62±1,70 p≤0,05) (Figura 56 b).

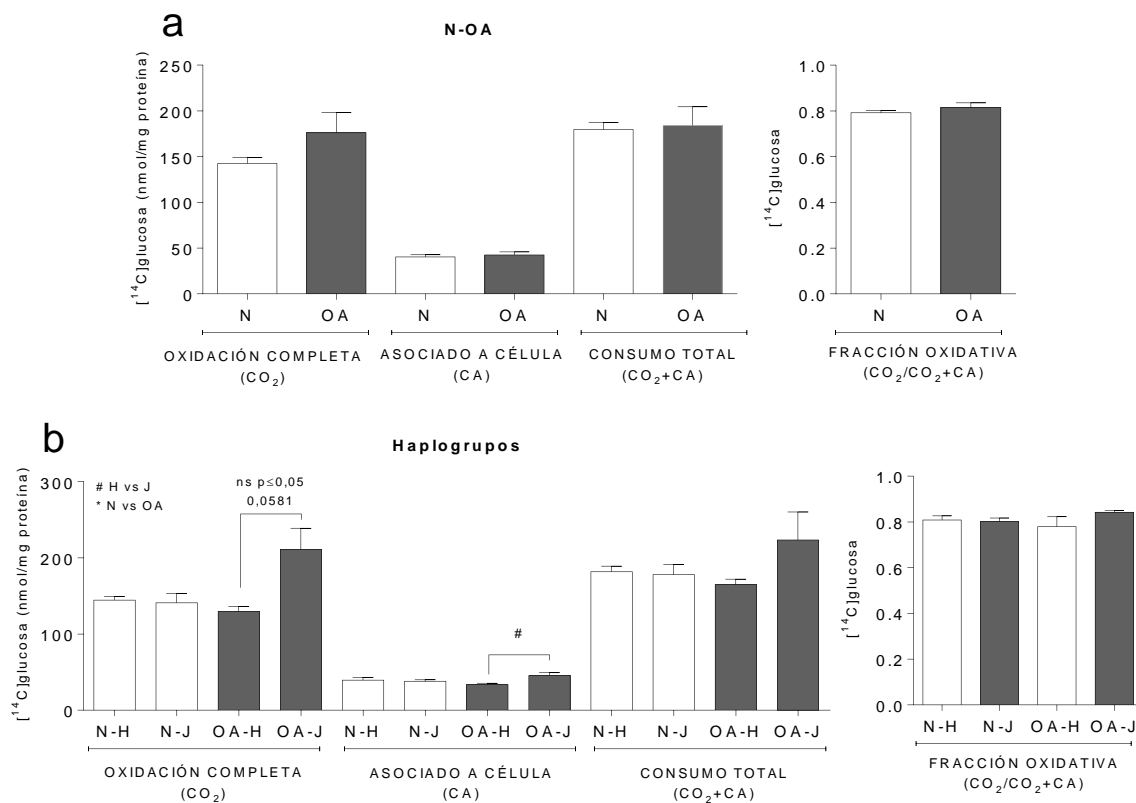


Figura 56 Determinación del metabolismo glucolítico en DMEM 1+P. **(a)** Parámetros glucolíticos evaluados en híbridos N y OA. **(b)** Parámetros glucolíticos evaluados haplogrupos de ADNmt. Los datos se representan como la media ± SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes realizados con 4 réplicas de cada condición y híbrido. * híbridos N y OA. # p≤0,05 haplogrupos de ADNmt H y J. ns: no significativo.

Con el objetivo de profundizar en el estudio del metabolismo de la glucosa, se analizó la expresión génica de enzimas implicadas en la glucólisis. Los datos reflejaron que, al cultivar las células en DMEM 4,5+P, únicamente los niveles de expresión de *solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1)*, transportador de glucosa al interior celular, están elevados en los híbridos OA en comparación con los N

Objetivo 4

(*SLC2A1* OA 1,38±0,17 vs N 0,99±0,08 p≤0,05). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los haplogrupos de ADNmt (Figura 57 a y b).

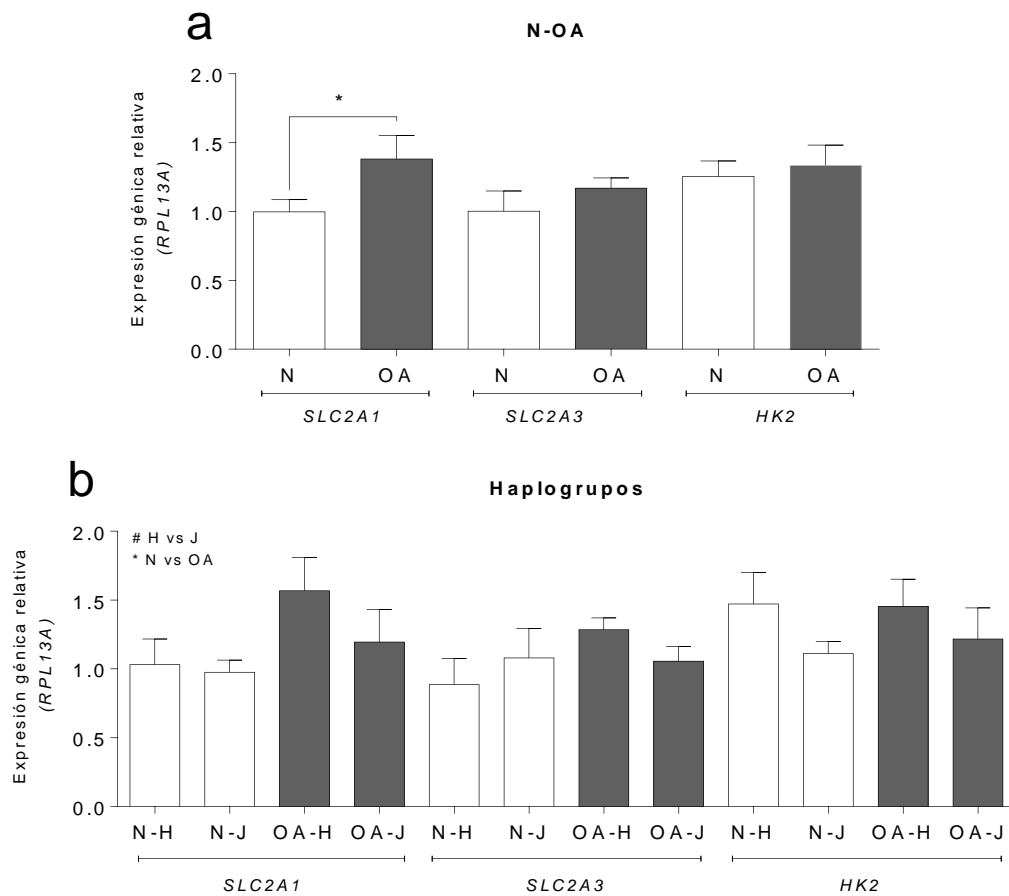


Figura 57 Determinación de la expresión génica de enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa en cíbridos crecidos en DMEM 4,5+P. **(a)** Análisis en cíbridos N y OA. **(b)** Análisis entre haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como media ± SEM de tres experimentos independientes. * p≤0,05 cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J.

Por su parte, a la hora de reducir la concentración de glucosa en el medio, se observó una disminución de los niveles *SLC2A1*, *solute carrier family 2 member 3* (*SLC2A3*) y *HK2*, en los cíbridos OA en comparación con los N (*SLC2A1* OA 0,78±0,06 vs N 1,40±0,18 p≤0,01; *SLC2A3* OA 0,65±0,08 vs N 1,53±0,15 p≤0,0001; *HK2* OA 0,86±0,03 vs N 1,37±0,19 p≤0,05) (Figura 58 a). Además, al realizar el análisis en función de los haplogrupos de ADNmt, los cíbridos N-J reflejaron niveles de expresión génica de *SLC2A1* y *HK2* menores que los cíbridos N-H (*SLC2A1* N-J 0,97±0,13 vs N-H 1,84±0,22 p≤0,01; *HK2* N-J 0,88±0,11 vs N-H 1,86±0,23 p≤0,01) (Figura 58 b).

Objetivo 4

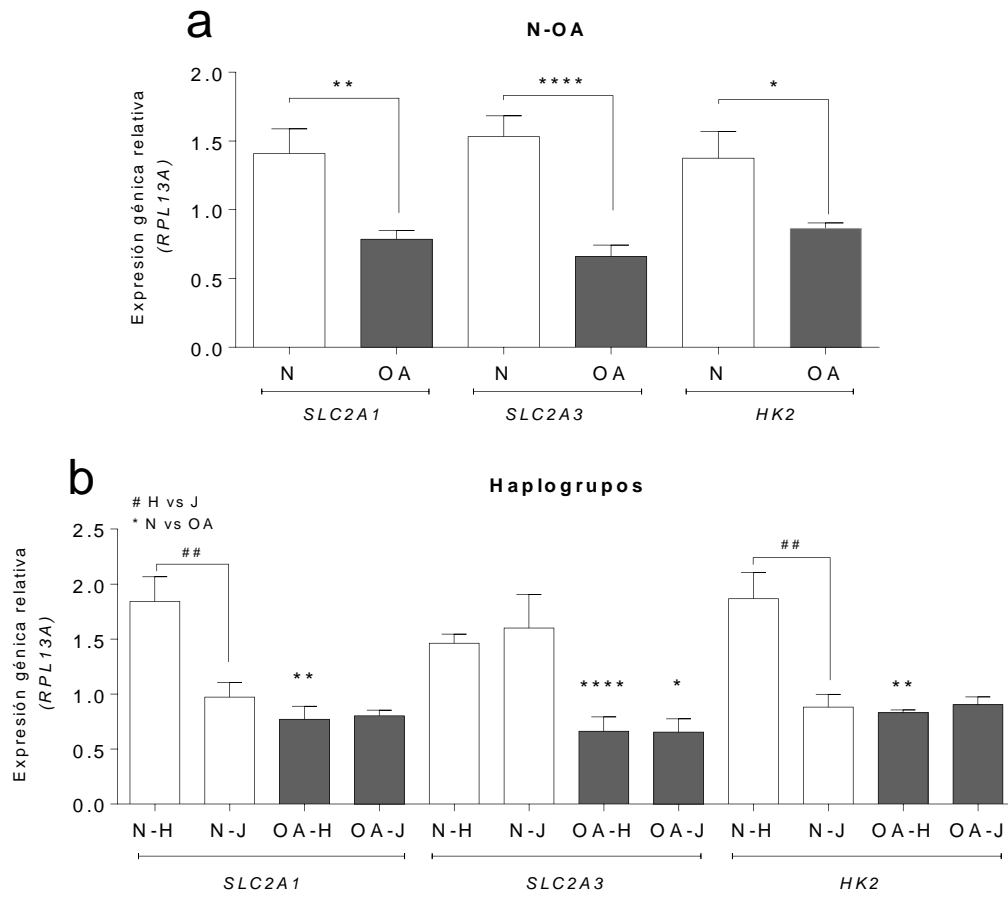


Figura 58 Determinación de la expresión génica de enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa en cíbridos crecidos en *DMEM* 1+P. **(a)** Cíbridos N y OA. **(b)** Haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$ cíbridos N y OA. ## $p \leq 0,01$ haplogrupos de ADNmt H y J.

A la hora de analizar los datos obtenidos entre ambos medios de cultivo testados, los resultados reflejaron que tanto los cíbridos N como los OA presentan niveles de CO_2 , CA, consumo total y fracción oxidativa más elevados al ser cultivados en *DMEM* 1+P en comparación con los datos obtenidos al crecer las células en *DMEM* 4,5+P, mostrando que, bajo una menor concentración de glucosa, las células son capaces de incrementar el metabolismo glucolítico (Figura 59 a y b).

Objetivo 4

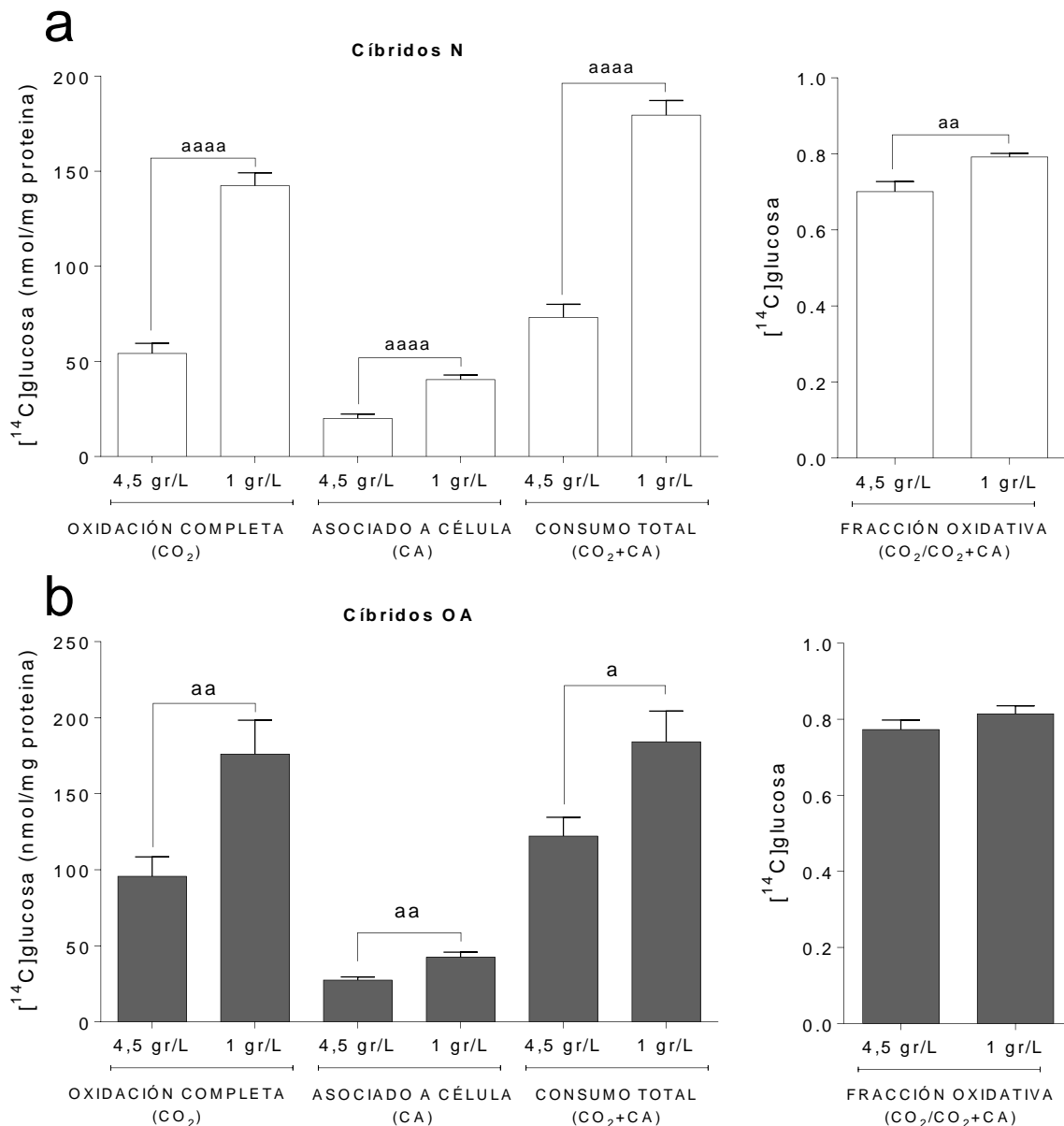


Figura 59 Análisis comparativo de los datos obtenidos el metabolismo glucolítico en DMEM 4,5+P y DMEM 1+P. Cíbridos N (a) y cíbridos OA (b). a p≤0,05, aa p≤0,01, aaaa p≤0,0001 DMEM 4,5 y 1.

4.- Estudio comparativo del metabolismo de la glucosa y el de los ácidos grasos mediante sustratos marcados radioactivamente

4.1 Estudio del metabolismo glucolítico y lipídico a nivel basal

El estudio del metabolismo basal de la glucosa y del ácido oleico se llevó a cabo mediante el empleo de sustratos radioactivos, analizando diferentes parámetros

Objetivo 4

del metabolismo tras 4 h de incubación y midiendo su incorporación a la célula a lo largo de 24 h.

Como se describió anteriormente, el análisis comparativo entre los cíbridos N y OA crecidos en DMEM 1+P no mostró ninguna diferencia a la hora de analizar el metabolismo basal de la glucosa (Figura 56 a). Asimismo, el análisis de los parámetros estudiados en este metabolismo en función de los haplogrupos de ADNmt H o J reflejó que los cíbridos OA-J tienden a oxidar (CO_2) y a incorporar (CA) más glucosa que los OA-H (Figura 56 b). Por su parte, no se observaron diferencias entre los grupos a la hora de estudiar la incorporación de glucosa al interior celular (Figura 60 a y b).

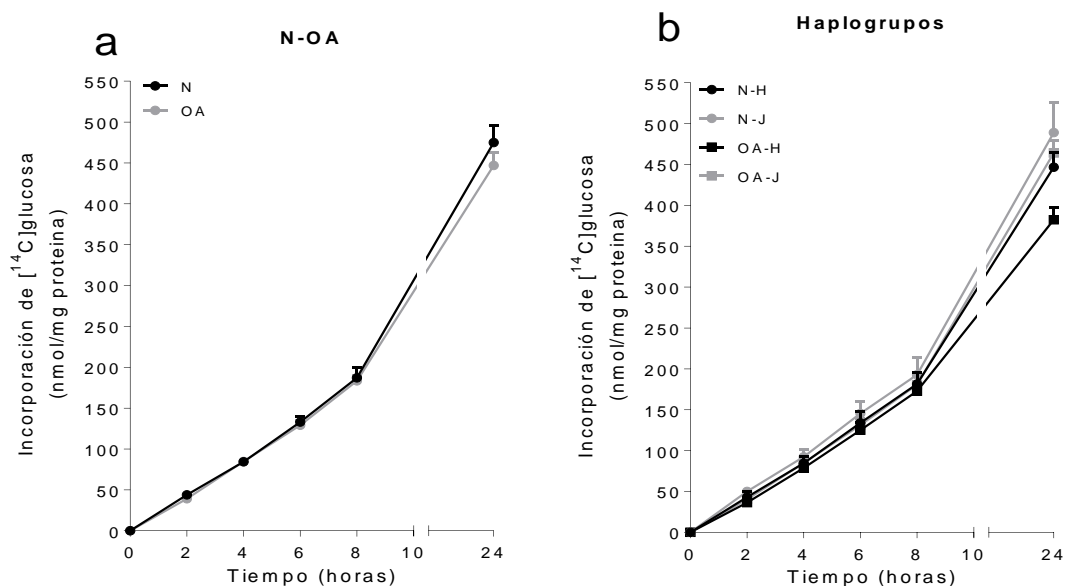


Figura 60 Incorporación de glucosa durante 24 h. Cíbridos N y OA (a) y haplogrupos de ADNmt (b). Los datos se representan como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes realizados con 4 réplicas de cada cíbrido. * cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J.

Tras el análisis del metabolismo basal del ácido oleico entre cíbridos N y OA, se observó que los cíbridos OA presentan una menor cantidad de metabolitos ácido-solubles (ASM) en el medio de cultivo, lo que se relaciona con una peor β -oxidación (OA $91,58 \pm 7,17$ vs N $127,90 \pm 9,05$ $p \leq 0,05$) (Figura 61 a). Al evaluar la función de los haplogrupos de ADNmt H y J en este metabolismo basal, los datos reflejaron que

Objetivo 4

los cíbridos N-J oxidan significativamente menos ácido oleico que los N-H, comportamiento diferencial que también aparece reflejado en la fracción oxidativa (oxidación completa N-J $20,87 \pm 3,41$ vs N-H $34,01 \pm 3,84$ $p \leq 0,05$; fracción oxidativa N-J $0,09 \pm 0,006$ vs N-H $0,13 \pm 0,005$ $p \leq 0,01$) (Figura 61 b).

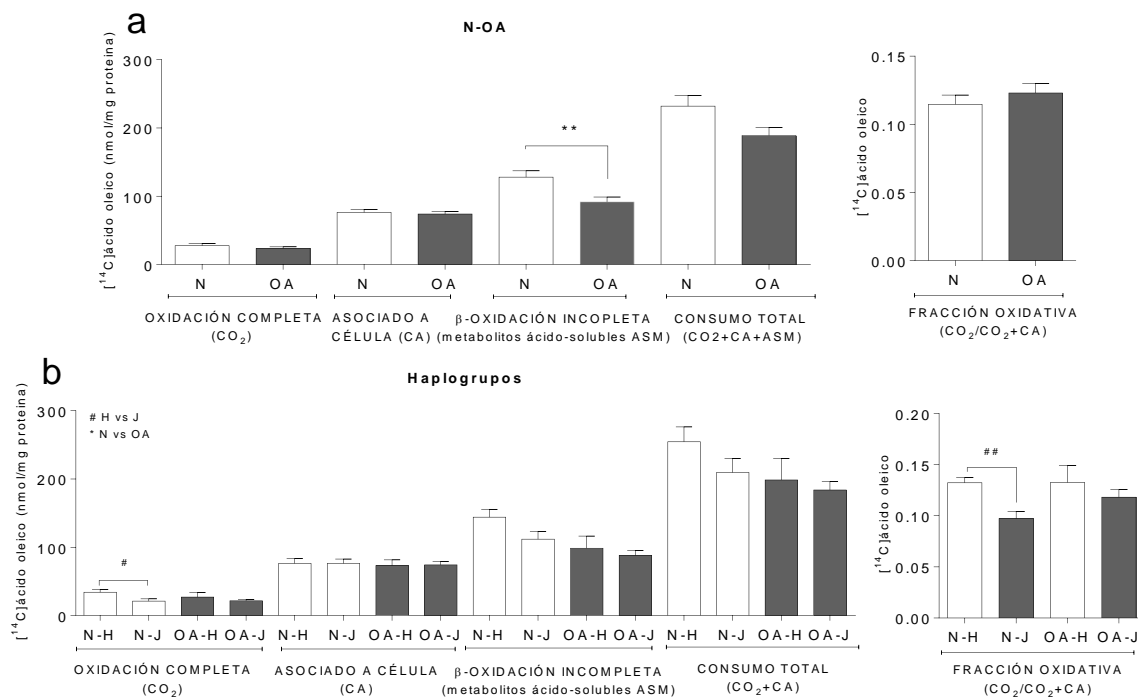


Figura 61 Metabolismo basal del ácido oleico. Parámetros analizados tras 4 h de oxidación de este sustrato. **(a)** Análisis comparativo entre cíbridos N y OA. **(b)** Análisis comparativo entre haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes realizados con 4 réplicas de cada cíbrido. ** $p \leq 0,01$ cíbridos N y OA. # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ haplogrupos de ADNmt H y J. Cuando se evaluó la incorporación de este sustrato al interior celular, no se observaron diferencias entre los grupos de cíbridos N y OA (Figura 62 a). Sin embargo, al analizar la incorporación de sustrato en función de los haplogrupos de ADNmt, los resultados mostraron que a lo largo de las primeras 8 h, los cíbridos N-J tuvieron niveles de radioactividad mayores que los N-H, reflejando mayor incorporación de ácido oleico al interior celular (2 h N-J $60,55 \pm 4,41$ vs N-H $39,12 \pm 3,66$ $p \leq 0,01$; 4 h N-J $110,17 \pm 7,31$ vs N-H $72,07 \pm 7,34$ $p \leq 0,01$; 6 h N-J $152,05 \pm 9,91$ vs N-H $100,95 \pm 10,67$ $p \leq 0,01$; 8 h N-J $183,86 \pm 11,62$ vs N-H $124,41 \pm 14,36$ $p \leq 0,05$) (Figura 62 b).

Objetivo 4

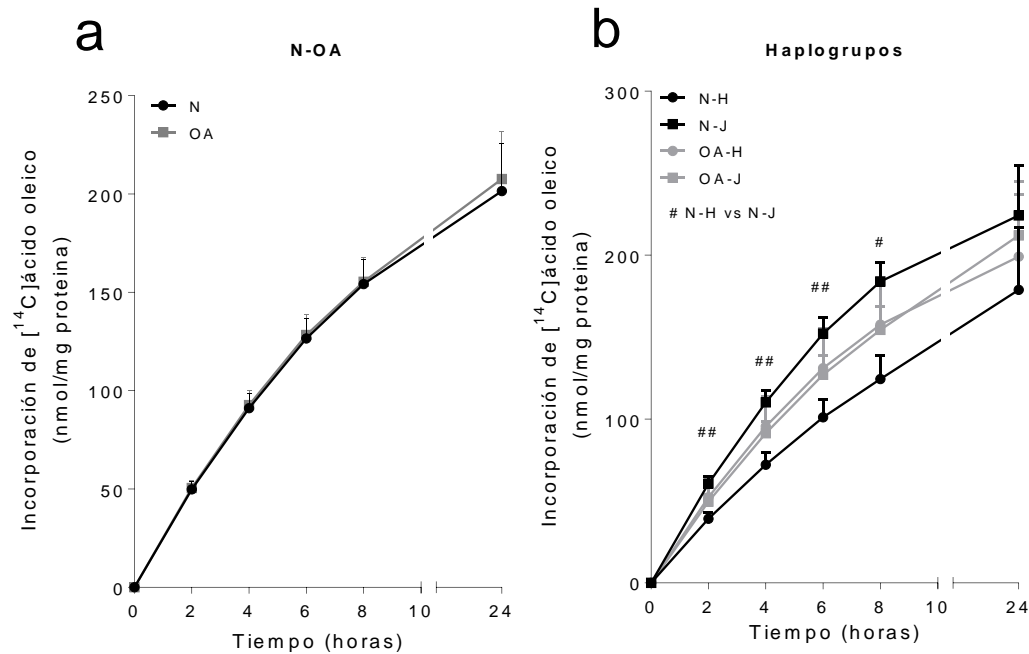


Figura 62 Incorporación de ácido oleico durante 24 h. Cíbridos N y OA **(a)** y haplogrupos de ADNmt **(b)**. Los datos se representan como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes realizados con 4 réplicas de cada cíbrido. *cíbridos N y OA. # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ haplogrupos de ADNmt H y J.

Al realizar el ratio entre el valor de ASM y la oxidación completa (CO_2), se observó que los cíbridos OA presentan menor eficiencia en la oxidación de ácidos grasos (OA $4,04 \pm 0,27$ vs N $4,99 \pm 0,29$, $p \leq 0,05$) (Figura 63 a). A la hora de realizar este análisis entre los haplogrupos de ADNmt, el ratio ASM/ CO_2 reflejó que los cíbridos N-J presentan una β -oxidación más eficiente que los N-H y que los OA-J (N-J $5,63 \pm 0,39$ vs N-H $4,34 \pm 0,23$, $p \leq 0,05$; vs OA-J $4,15 \pm 0,35$, $p \leq 0,05$) (Figura 63 b).

Objetivo 4

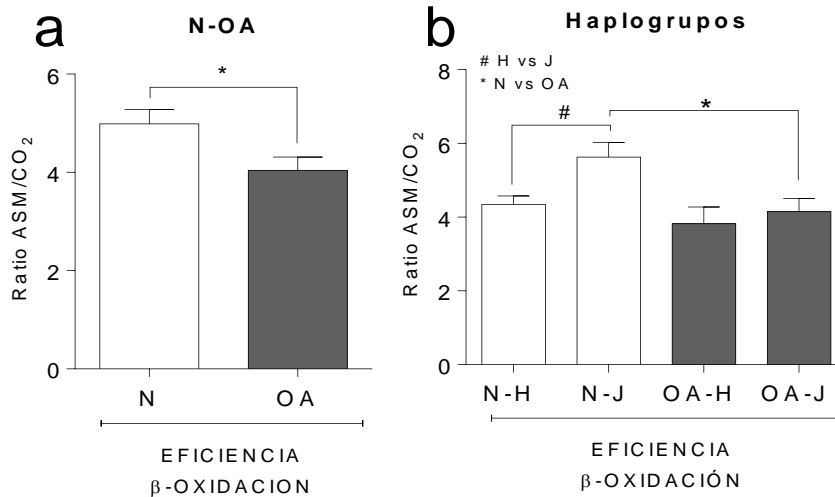


Figura 63 Metabolismo basal del ácido oleico. Eficiencia de la β -oxidación tras 4 h de oxidación de este sustrato. **(a)** Análisis comparativo entre híbridos N y OA. **(b)** Análisis comparativo entre haplogrupos de ADNmt H y J. Los datos se representan como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes realizados con 4 réplicas de cada condición y híbrido. * $p \leq 0,05$ híbridos N y OA. # $p \leq 0,05$ haplogrupos de ADNmt H y J.

Una vez obtenidos y analizados los parámetros característicos para cada uno de los metabolismos basales (glucolítico y lipídico), se realizó un análisis comparativo entre ambos con el objetivo de estudiar el comportamiento diferencial de los híbridos frente a la disponibilidad de sustrato.

El análisis entre ambos metabolismos reflejó que, tanto los híbridos N como los OA presentan el mismo comportamiento, ya que ambos oxidan significativamente más glucosa que ácido oleico e incorporan más ácido oleico que glucosa, a pesar de que el consumo de ambos sustratos es similar. Al realizar este análisis en función de los haplogrupos de ADNmt H y J, se observó la misma tendencia descrita en los híbridos N, donde las células portadoras de ambos haplogrupos de ADNmt oxidaron más glucosa e incorporaron más ácido oleico. Sin embargo, entre los híbridos OA, solamente los OA-J mostraron mayor oxidación de la glucosa, mientras que ambos (OA-H y OA-J) mostraron mayor fracción oxidativa de la glucosa frente al oleico (Tabla 20).

Objetivo 4

Tabla 20 Análisis comparativo entre el metabolismo basal de la glucosa y del ácido oleico en cíbridos tras 4 h de oxidación con cada sustrato por separado.

	OXIDACIÓN COMPLETA (CO ₂)		ASOCIADO A CÉLULA (CA)	
	[¹⁴ C]glucosa	[¹⁴ C]ácido oleico	[¹⁴ C]glucosa	[¹⁴ C]ácido oleico
N	58,52±3,86	27,44±3,15 ^{aaaa}	45,92±5,73	76,29±4,46 ^{aaaa}
OA	66,28±8,47	23,31±2,29 ^{aaa}	50,41±9,19	73,76±3,93 ^a
N-H	60,10±3,93	34,01±3,83 ^{aaa}	49,69±7,40	76,30±6,89 ^a
N-J	56,95±7,00	20,87±3,41 ^{aaa}	42,16±9,17	76,27±6,33 ^a
OA-H	56,48±11,78	26,84±6,38	46,73±17,53	73,12±8,23
OA-J	71,18±11,42	21,55±1,61 ^{aa}	52,26±11,80	74,08±4,84
	CONSUMO TOTAL (CO ₂ +CA)		FRACCIÓN OXIDATIVA (CO ₂ /CO ₂ +CA)	
	[¹⁴ C]glucosa	[¹⁴ C]ácido oleico	[¹⁴ C]glucosa	[¹⁴ C]ácido oleico
N	104,44±9,29	104,00±7,07	0,57±0,02	0,25±0,02 ^{aaaa}
OA	116,60±17,42	97,08±5,56	0,59±0,02	0,23±0,01 ^{aaaa}
N-H	109,78±10,86	110,40±10,56	0,56±0,02	0,30±0,01 ^{aaaa}
N-J	99,11±15,8	97,59±9,61	0,60±0,04	0,20±0,01 ^{aaaa}
OA-H	102,80±28,94	99,96±13,94	0,57±0,06	0,26±0,01 ^a
OA-J	123,4±23,07	95,63±5,85	0,59±0,02	0,22±0,01 ^{aaaa}

Valores presentados como media ± SEM en nmol/mg proteína. ^a glu vs ole (^ap≤0.05, ^{aaa}p≤0.005, ^{aaaa}p≤0.001, ^{aaaaa}p≤0.0001). N: normal (rojo y ver claro). OA: artrósico (rojo y verde oscuro). Rojo: glucosa marcada radioactivamente. Verde: ácido oleico marcado radioactivamente.

4.2 Determinación del efecto del ácido oleico en el metabolismo de la glucosa

Para evaluar el efecto de añadir al medio de cultivo tanto glucosa como ácido oleico (DMEM glu/ole) en el metabolismo de la glucosa, se analizaron los parámetros correspondientes a este metabolismo realizando un análisis comparativo frente al cultivo solo con glucosa (DMEM 1+P, basal).

Al realizar un primer análisis frente a la condición basal (DMEM 1+P), se observó que la presencia del ácido oleico en el medio de cultivo únicamente moduló el

Objetivo 4

metabolismo de los cíbridos N, incrementando significativamente el CO₂ y el consumo total de glucosa (**CO₂ N 1,19±0,07, consumo total N 1,12±0,09 vs basal 1,00±0,10 p≤0,01**) (Figura 64 a). El segundo análisis realizado entre los cíbridos N y OA cultivados en presencia de glucosa y ácido oleico relativizados frente a la condición basal (DMEM 1+P), puso de relevancia que los cíbridos N presentaron mayor CO₂ y fracción oxidativa de glucosa que los OA.

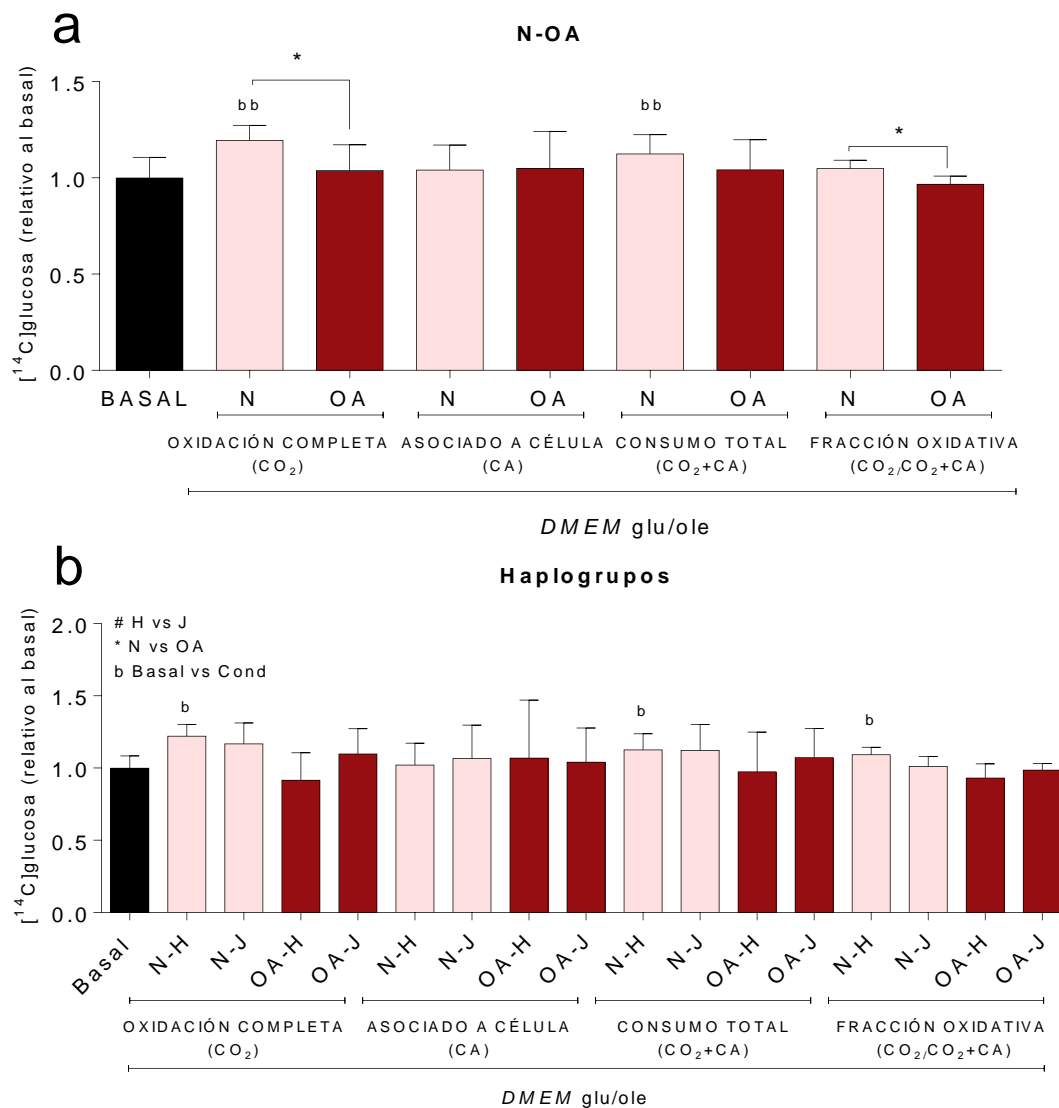


Figura 64 Efecto del ácido oleico en el metabolismo de la glucosa. **(a)** Análisis del efecto del ácido oleico a 100 μM (DMEM glu/ole) comparado con el basal (DMEM 1+P) en el metabolismo de la glucosa en cíbridos N (rojo claro) y OA (rojo oscuro) mediante el ensayo de oxidación de la glucosa. **(b)** Análisis entre los haplogrupos de ADNmt. Los datos se representan como la media ± SEM y se

Objetivo 4

obtuvieron a partir de tres experimentos independientes. b $p \leq 0,05$, bb $p \leq 0,01$ DMEM glu/ole frente al basal (DMEM 1+P). * $p \leq 0,05$ cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J.

Estos datos reflejan que los cíbridos N presentan una mejor respuesta que los OA cuando la disponibilidad de sustrato cambia (**CO₂ N** $1,19 \pm 0,07$ vs **OA** $1,03 \pm 0,13$ $p \leq 0,05$; **fracción oxidativa N** $1,05 \pm 0,04$ vs **OA** $0,96 \pm 0,04$ $p \leq 0,05$) (Figura 64 a).

Al realizar el análisis en función de los haplogrupos de ADNmt, los datos reflejaron que solamente los cíbridos N-H presentan niveles de CO₂, consumo total y fracción oxidativa mayores que el basal cuando se cultivan en presencia de ácido oleico (**N-H CO₂** $1,22 \pm 0,08$, **consumo total** $1,12 \pm 0,11$, **fracción oxidativa** $1,09 \pm 0,05$ vs **basal** $1,00 \pm 0,08$ $p \leq 0,05$) (Figura 64 b).

Teniendo en cuenta la diferente respuesta descrita entre los cíbridos N y OA ante ambos sustratos y con el objetivo de estudiar si la presencia de ácido oleico podría tener algún impacto en el estrés oxidativo, se analizó la producción de anión superóxido (O₂⁻) mitocondrial bajo las mismas condiciones de cultivo.

Los resultados obtenidos al evaluar los niveles de producción de O₂⁻ reflejaron que la presencia de ácido oleico en el medio de cultivo provocó un incremento del estrés oxidativo en los cíbridos OA frente a los N, lo que muestra una peor adaptabilidad de los cíbridos OA frente a una nueva condición nutritiva (**OA** $1,29 \pm 0,12$ vs **N** $0,95 \pm 0,06$ $p \leq 0,05$) (Figura 65 a). Al realizar el análisis en función de los haplogrupos de ADNmt, se observó que los cíbridos N-J presentaron niveles de producción de este compuesto más bajos que los N-H y en comparación con el basal, reflejando una mejor adaptabilidad frente a la disponibilidad de ambos sustratos (**N-J** $0,73 \pm 0,08$ vs **N-H** $1,40 \pm 0,09$ $p \leq 0,01$, vs **basal** $1,00 \pm 0,06$ $p \leq 0,05$) (Figura 65 b).

Dada las diferencias descritas hasta el momento en el comportamiento de los cíbridos en función de la disponibilidad de sustrato, se analizó la expresión génica

Objetivo 4

de los dos transportadores clave para la captación de ambos sustratos al interior mitocondrial *MPC2* (glucosa - piruvato) y *CPT1b* (ácidos grasos - Fa-CoA).

El análisis de los niveles de expresión de *MPC2* entre N y OA no mostró diferencias al crecer las células en *DMEM* glu/ole. Sin embargo, cuando se analizaron entre haplogrupos de ADNmt, los datos reflejaron que los cíbridos N-J y OA-H expresan menos este gen en comparación con los N-H (N-J $0,89\pm0,04$, OA-H $0,91\pm0,13$ vs N-H $1,27\pm0,06$ $p\leq0,01$, $p\leq0,05$, respectivamente) (Figura 65 c-d).

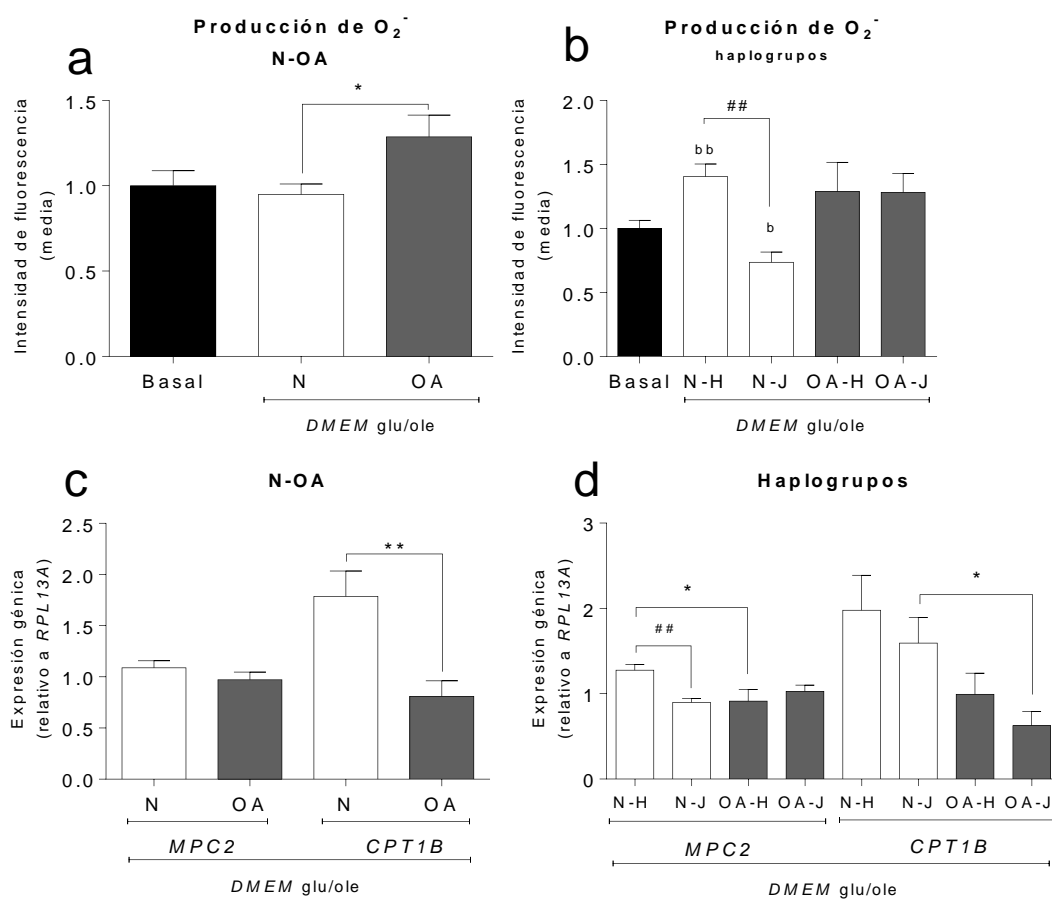


Figura 65 Efecto del ácido oleico en el estrés oxidativo. **(a)** Análisis del efecto del ácido oleico a 100 μ M (*DMEM* glu/ole) comparado con el basal (*DMEM* 1+P) en la producción de O₂⁻ en cíbridos N y OA mediante citometría de flujo. **(b)** Análisis en los haplogrupos de ADNmt. **(c)** Análisis del efecto del ácido oleico en la expresión génica de *MPC2* y *CPT1b* en cíbridos N y OA. **(d)** Análisis en haplogrupos de ADNmt. Los datos se representan como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes. b $p\leq0,05$, bb $p\leq0,01$ *DMEM* glu/ole frente al basal (*DMEM* 1+P). * $p\leq0,05$, ** $p\leq0,01$ cíbridos N y OA. ## $p\leq0,01$ haplogrupos de ADNmt.

Objetivo 4

Los datos de expresión génica de *CPT1b* revelaron que los cíbridos OA presentan niveles de expresión de esta enzima menores que los cíbridos N, siendo los cíbridos OA-J los que contribuyen en mayor medida a esta diferencia (OA $0,80\pm 0,15$ vs N $1,78\pm 0,24$ $p\leq 0,01$; OA-J $0,62\pm 0,16$ vs N-J $1,59\pm 0,30$ $p\leq 0,05$) (Figura 65 c-d).

4.3 Estudio de la flexibilidad metabólica de los cíbridos transmitocondriales

Teniendo en cuenta la respuesta diferencial de los cíbridos, en primer lugar, se analizó el efecto de los inhibidores en la viabilidad celular y los resultados reflejaron que las concentraciones y los tiempos de incubación testados no afectaron a la viabilidad celular (Anexo II- Figura 4).

Dado que los cíbridos N y OA presentaron una diferente adaptabilidad o respuesta frente a los sustratos presentes en el medio de cultivo, el siguiente paso consistió en evaluar la flexibilidad metabólica. Para ello, las células se cultivaron en DMEM glu/ole durante 48 h y se estudió el metabolismo empleando D-[^{14}C (U)]glucosa y [1- ^{14}C]ácido oleico en presencia de los inhibidores etomoxir y UK5099, respectivamente. De esta manera, se estudió cómo las células, en presencia de ambos sustratos, eran capaces de adaptar el metabolismo de la glucosa teniendo bloqueado el metabolismo de los ácidos grasos (etomoxir) y viceversa.

Los resultados mostraron que la inhibición con etomoxir incrementó significativamente la producción de CO_2 , el CA y el consumo total de glucosa en los cíbridos N pero no en los OA, donde se reflejó un descenso de la fracción oxidativa de la glucosa en comparación con la condición basal (CO_2 N $1,14\pm 0,10$, CA N $1,13\pm 0,13$, **consumo total** N $1,13\pm 0,11$, **fracción oxidativa** OA $0,93\pm 0,05$ vs **basal** $1,00\pm 0,06$, $p\leq 0,01$, $p\leq 0,0001$, $p\leq 0,001$, $p\leq 0,05$, respectivamente) (Figura 66 a). Por su parte, cuando se inhibió con UK5099, solamente los cíbridos OA presentaron un incremento significativo del CO_2 y la fracción oxidativa del ácido oleico comparado con la condición basal, sin embargo, esto no ocurrió en los

Objetivo 4

cíbridos N (CO_2 OA $1,35 \pm 0,16$, fracción oxidativa OA $1,22 \pm 0,12$ vs basal $1,00 \pm 0,06$, $p \leq 0,05$) (Figura 66 b).

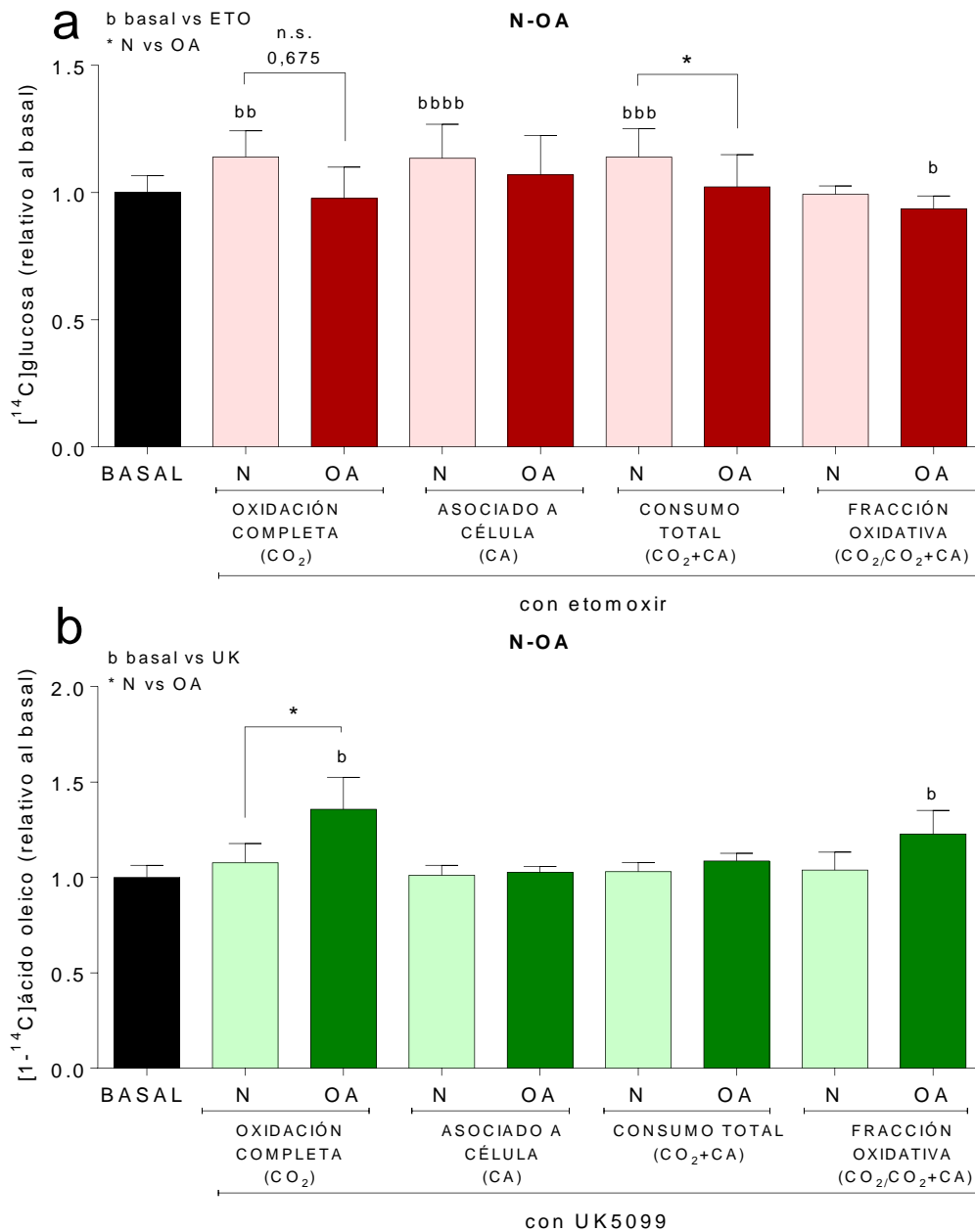


Figura 66 Flexibilidad metabólica en cíbridos N (claro) y OA (oscuro). **(a)** Efecto de la inhibición de la ruta de los ácidos grasos con $10 \mu\text{M}$ de etomoxir en el metabolismo de la glucosa comparado con la condición basal (*DMEM* glu/ole). **(b)** Efecto de la inhibición de la ruta de la glucosa con $20 \mu\text{M}$ de UK5099 en el metabolismo de los ácidos grasos comparado con la condición basal (*DMEM* glu/ole). Los datos se representan como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes con cuatro réplicas por condición y cíbrido. b $p \leq 0,05$, bb $p \leq 0,01$, bbb $p \leq 0,001$, bbbbb $p \leq 0,0001$ condición de cultivo con inhibidor frente al basal (*DMEM* glu/ole). * $p \leq 0,05$ cíbridos N y OA. Barras rojas: glucosa marcada radioactivamente. Barras verdes: ácido oleico marcado radioactivamente.

Objetivo 4

Estos datos en conjunto muestran que la inhibición con etomoxir en los cíbridos N aumenta el consumo de glucosa y presentan una tendencia a oxidar más este sustrato que los OA manteniendo un perfil más glucolítico. Sin embargo, la inhibición con UK5099 reflejó que los cíbridos OA mostraron mayor oxidación completa del ácido oleico (**consumo de glucosa N** $1,13 \pm 0,11$ vs **OA** $1,02 \pm 0,12$ $p \leq 0,05$; **CO₂ de ácido oleico OA** $1,35 \pm 0,16$ vs **N** $1,07 \pm 0,10$, $p \leq 0,05$) (Figura 66 a y b).

A la hora de analizar estos parámetros en función de los haplogrupos de ADNmt, se observó que solamente en el caso del estudio del metabolismo de la glucosa en presencia de etomoxir, los cíbridos N-H y N-J son capaces de incrementar el CO₂, CA y consumo total de la glucosa, poniendo de manifiesto que los haplogrupos de ADNmt no juegan un papel relevante en este proceso, ya que ambos muestran la misma respuesta (**basal** $1,00 \pm 0,06$ vs **CO₂ NH** $1,11 \pm 0,10$ $p \leq 0,05$; **CA N-H** $1,12 \pm 0,16$ $p \leq 0,01$, **N-J** $1,14 \pm 0,22$ $p \leq 0,05$; **consumo total N-H** $1,12 \pm 0,12$, **N-J** $1,15 \pm 0,20$ $p \leq 0,05$) (Figura 67 a-b).

Estos datos sugieren que los cíbridos N son capaces de incrementar y adaptar el metabolismo de la glucosa cuando la ruta de los ácidos grasos se encuentra bloqueada, mostrando flexibilidad metabólica mitocondrial. Los cíbridos OA, por su parte, incrementaron solamente la oxidación del ácido oleico cuando se inhibió la ruta glucolítica reflejando una flexibilidad metabólica mitocondrial reducida y mostrando preferencia por el metabolismo de los ácidos grasos (Figura 68).

Objetivo 4

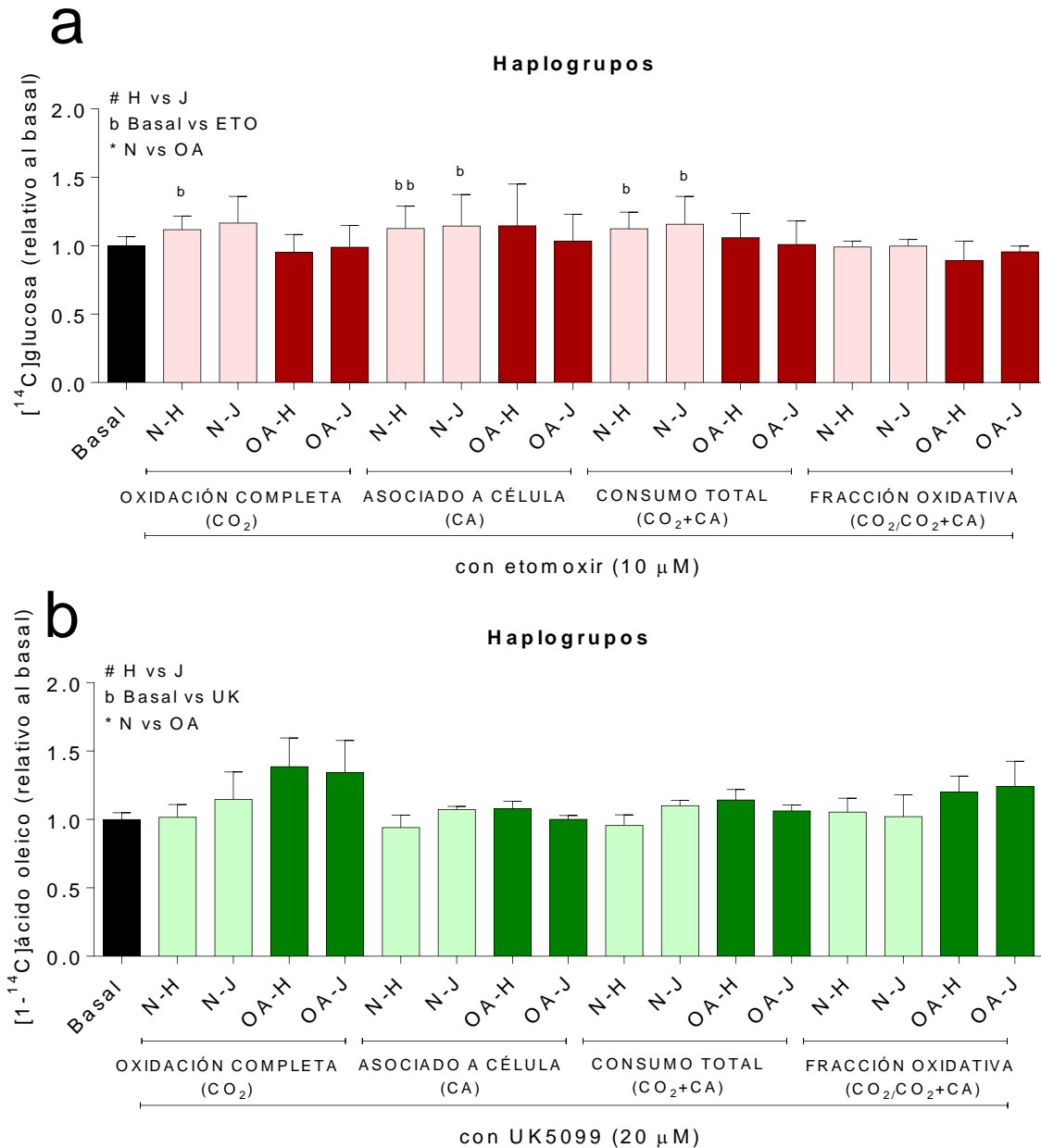


Figura 67 Flexibilidad metabólica, análisis por haplogrupos de ADNmt. (a) Efecto del etomoxir en el metabolismo de la glucosa frente la condición basal (DMEM glu/ole). (b) Efecto del UK5099 en el metabolismo de los ácidos grasos frente la condición basal (DMEM glu/ole). Los datos se representan como la media ± SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes con cuatro réplicas por condición y cúbido. b p≤0,05, bb p≤0,01 inhibidor frente al basal (DMEM glu/ole). Barras rojas: glucosa marcada radioactivamente. Barras verdes: ácido oleico marcado radioactivamente. N: claro. OA: oscuro

Teniendo en cuenta todos estos datos, se analizó el efecto de los inhibidores en parámetros relacionados con el estrés oxidativo y la expresión de genes relacionados con los procesos básicos de la dinámica mitocondrial (fusión y fisión), estando este proceso relacionado con la respuesta frente a estrés celular y a la disponibilidad a nutrientes que influye en el metabolismo celular.

Objetivo 4

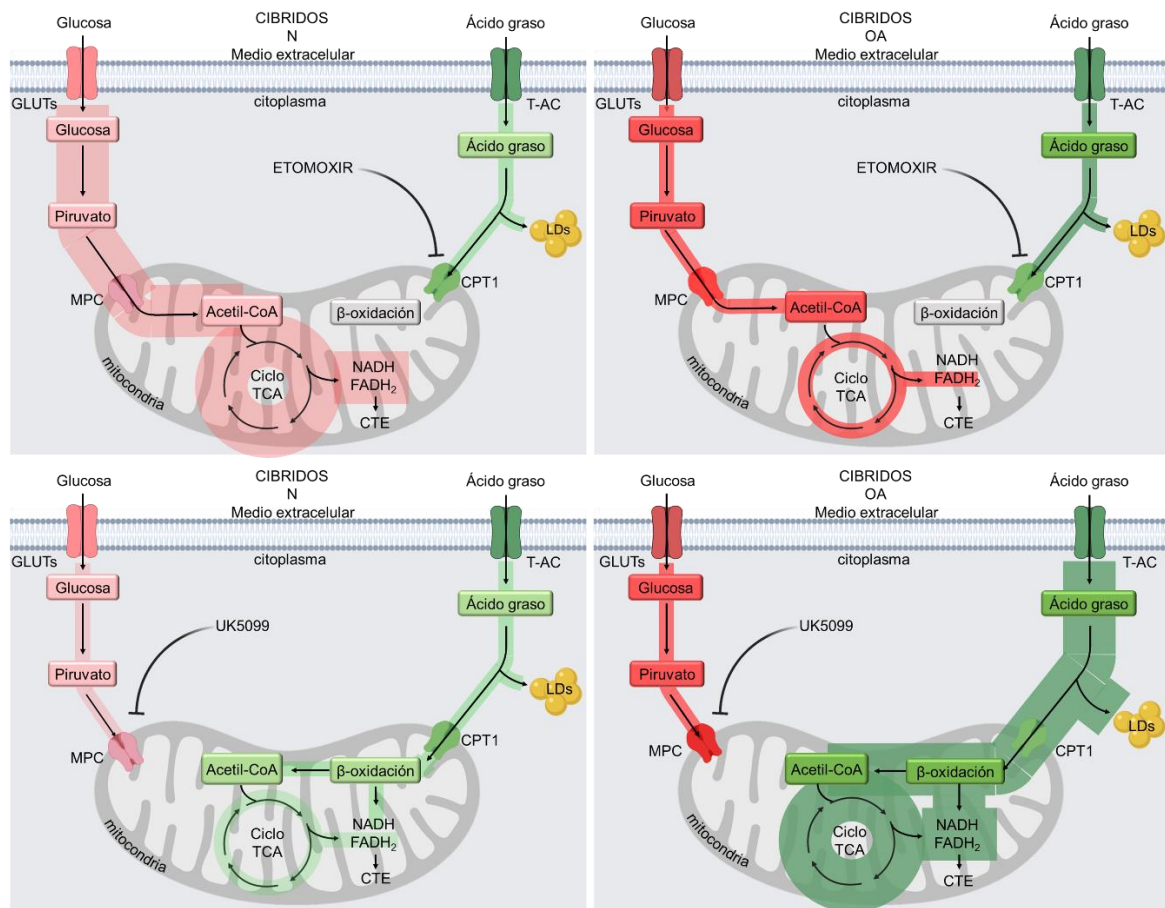


Figura 68 Representación gráfica de los resultados obtenidos en el análisis de la flexibilidad metabólica mediante el empleo de inhibidores. GLUTs: transportadores de glucosa. T-AC: transportadores de ácidos grasos. MPC: transportador mitocondrial de piruvato. CPT1b: transportador mitocondrial de ácidos grasos. LDs: gotas lipídicas. CTE: cadena de transporte electrónico. TCA: ciclo ácido tricarbóxicos.

El análisis del estrés oxidativo llevado a cabo mediante el análisis de la producción de O₂⁻ en presencia de etomoxir y UK5099 reflejó que, en comparación con la condición basal, únicamente la incubación con UK5099 incrementa los niveles de producción de O₂⁻ en ambos tipos de cíbridos (N y OA) (**basal** 1,00±0,06 vs N 1,41±0,11 p≤0,01, OA 1,28±0,11 p≤0,05) (Figura 69 a).

Al analizar los niveles de expresión de las enzimas *mitofusin 2 (MFN2)* y *mitochondrial fission 1 protein (FIS1)*, relacionadas con los procesos de fusión y fisión mitocondrial, respectivamente, se observó que solamente los N son capaces de incrementar la expresión génica de *MFN2* en presencia de UK5099 (**basal** 1,00±0,10 vs N 1,47±0,11 p≤0,01) (Figura 69 b). La incubación de las células en presencia de

Objetivo 4

etomoxir incrementó los niveles de *FIS1* en ambos tipos de cíbridos, pero en el análisis entre N y OA no fue estadísticamente significativo ($P=0,055$). Por su parte, los niveles de expresión de *FIS1* se vieron reducidos al crecer ambos tipos de células en presencia de UK5099, siendo los cíbridos OA los que tuvieron niveles más bajos (**Basal** $1,00\pm 0,08$ vs **OA** $0,47\pm 0,04$ $p\leq 0,001$; **OA** vs **N** $0,65\pm 0,04$ $p\leq 0,05$) (Figura 69 c).

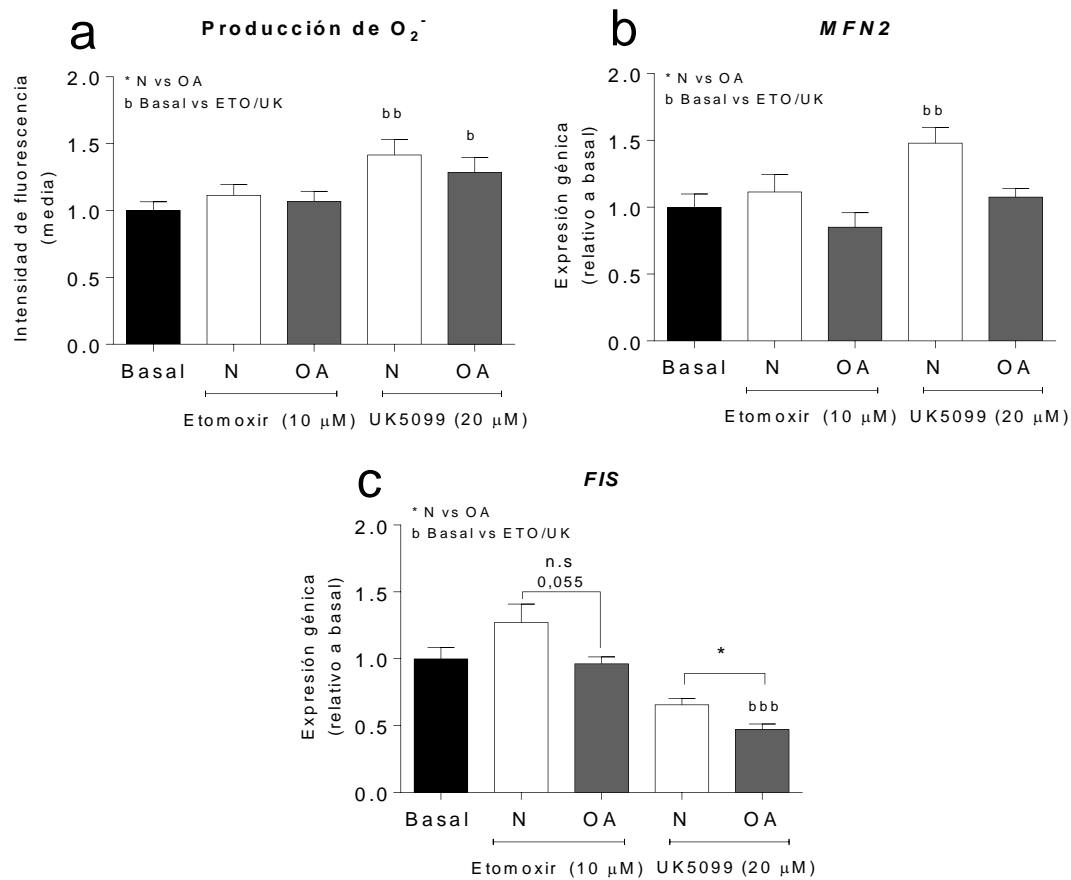


Figura 69 Análisis del efecto de los inhibidores mitocondriales etomoxir y UK5099 en la respuesta al estrés oxidativo tras 48h en *DMEM* glu/ole. **(a)** Análisis de la producción de O_2^- . **(b)** Análisis de la expresión génica de *MFN2*. **(c)** Análisis de la expresión génica de *FIS1*. * cíbridos N y OA. b inhibidor frente basal (*DMEM* glu/ole).

Objetivo 4

5.- Análisis del almacenamiento celular de los principales sustratos metabólicos: glucosa y ácidos grasos

5.1 Determinación del almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno y otras glucoproteínas: tinción de PAS

Para evaluar la incorporación y almacenamiento de la glucosa en el interior celular se realizó la tinción de PAS. Esta técnica se basa en el empleo del reactivo de *Schiff* que marca grupos – OH, característicos de moléculas como el glucógeno o glucoproteínas.

El análisis de las imágenes, así como su cuantificación, reflejaron que no existen diferencias entre los grupos de híbridos estudiados crecidos tanto en *DMEM* 4,5+P y *DMEM* 1+P, como en *DMEM* glu/ole (Figura 70 a-c).

Objetivo 4

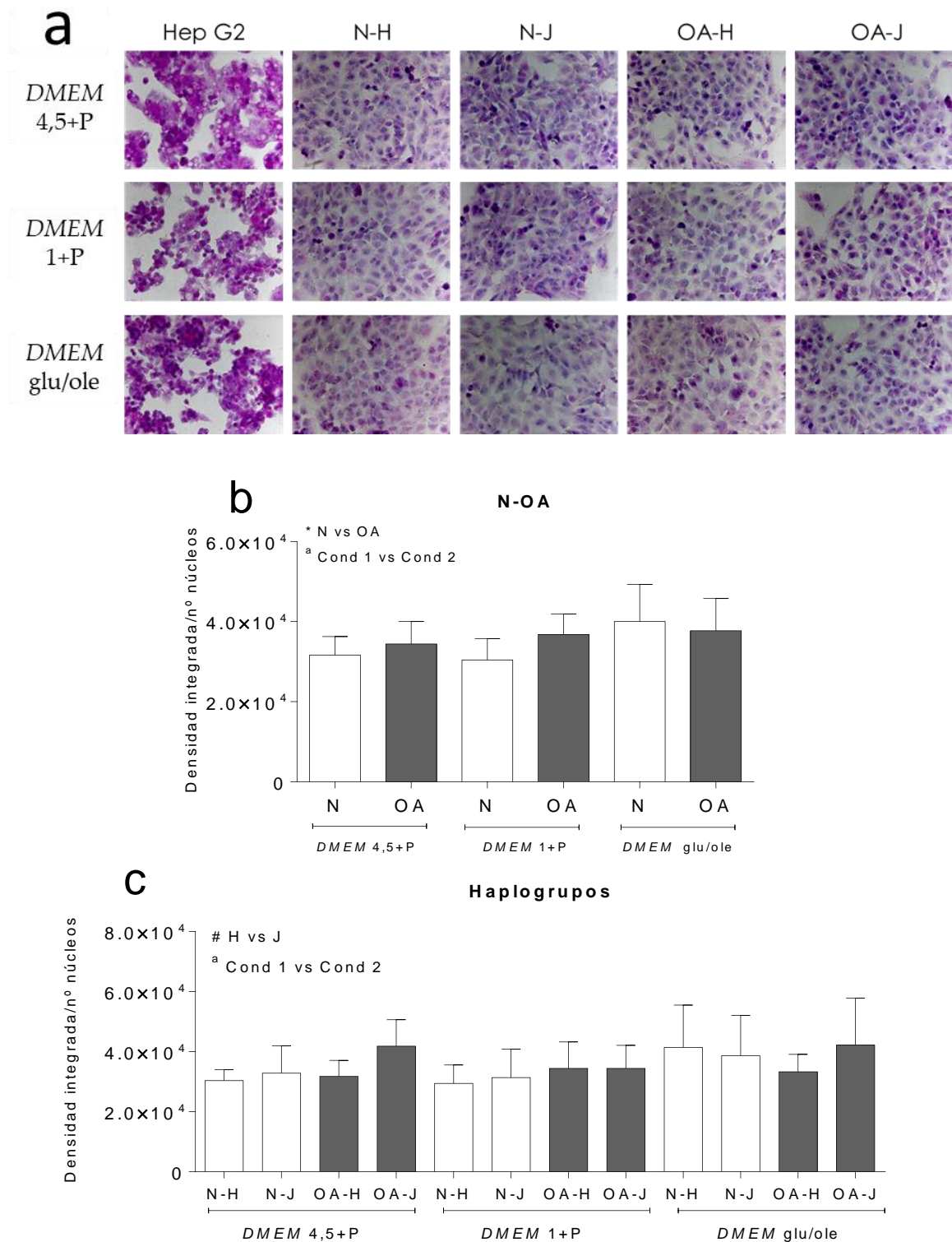


Figura 70 Determinación de la acumulación de glucosa en el interior celular mediante marcaje PAS. **(a)** Imágenes representativas tomadas mediante microscopía. **(b-c)** Cuantificación de la densidad de la tinción mediante el análisis con Image J. Los datos se representan como la media ± SEM de tres experimentos independientes analizando 4 campos por condición y híbrido. * híbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J. a entre medios de cultivo. Hep G2: control de técnica. Magnificación de las imágenes: 200.

Objetivo 4

5.2 Análisis de la distribución del ácido oleico e incorporación de ácidos grasos en forma de gotas lipídicas (*Lipid droplets- LDs*)

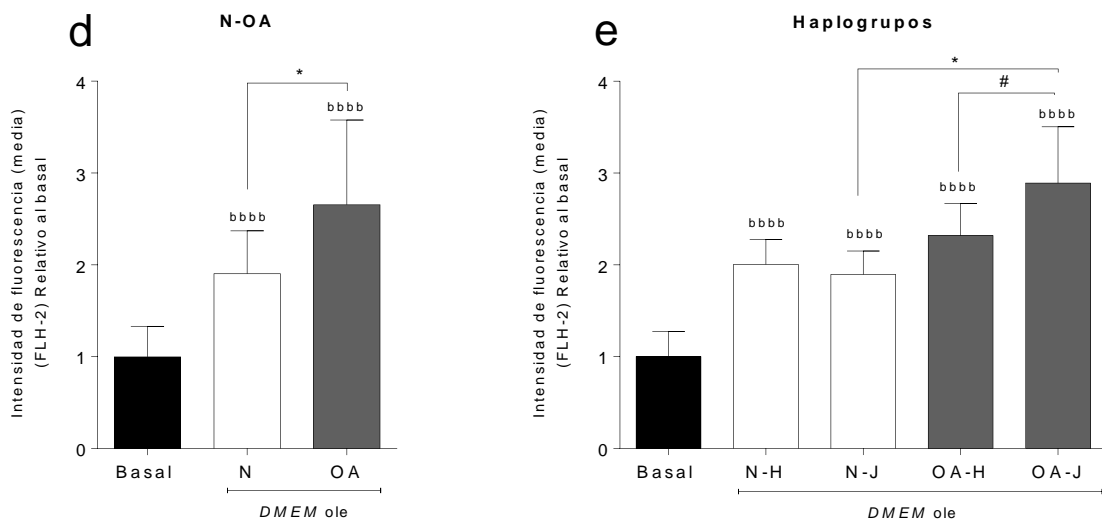
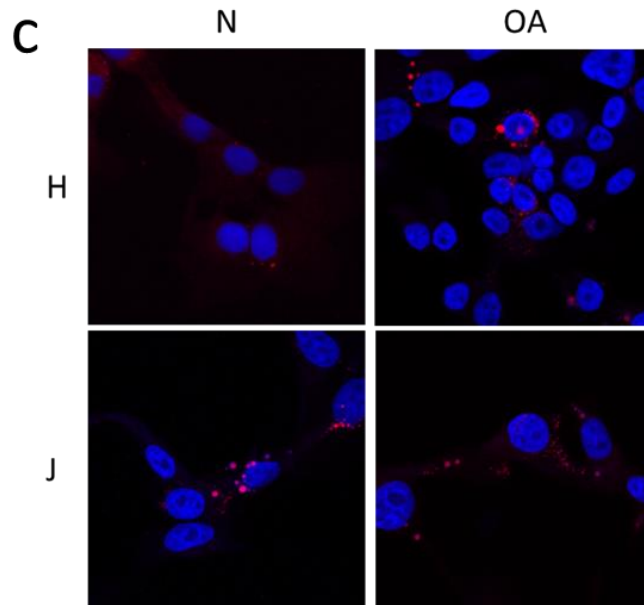
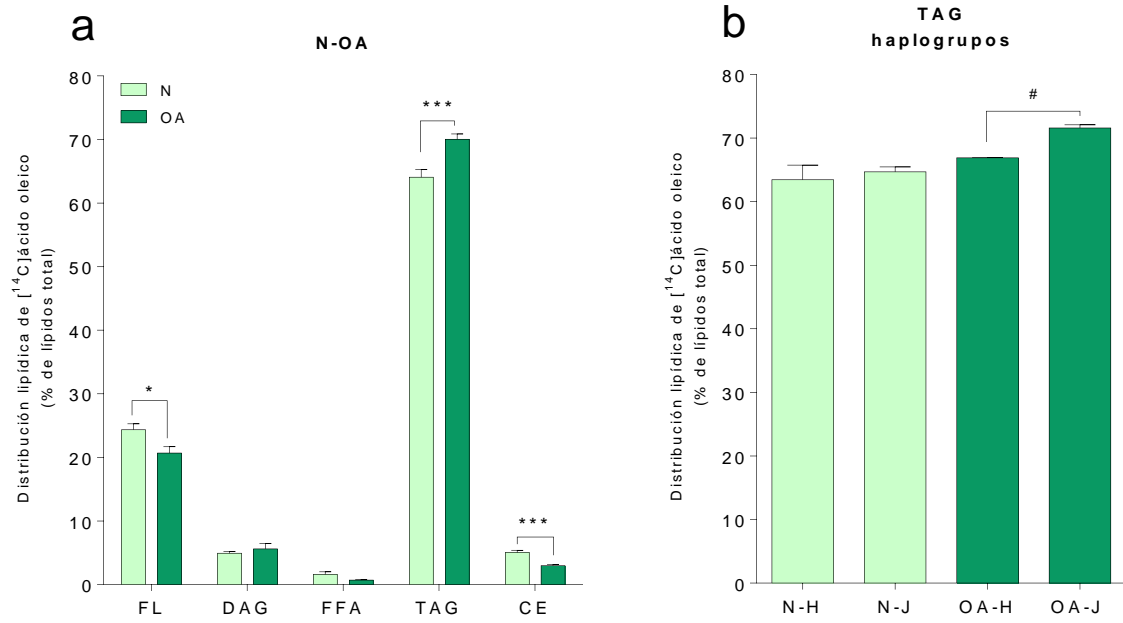
Para estudiar la incorporación de ácido oleico en el interior celular y su almacenamiento en forma de gotas lipídicas, se utilizó de nuevo sustratos marcados radioactivamente. Además, el marcaje específico de estas estructuras (*LDs*) se realizó con LD540.

El análisis de la distribución lipídica en el interior celular mostro que la mayor parte del ácido oleico se incorporó en forma de triacilgliceroles (TAG) y fosfolípidos (FL), correspondiéndose con un 70% y un 25% del total de lípidos, respectivamente. Ambos tipos de cíbridos (N y OA) mostraron un patrón de distribución lipídica diferente, así, los cíbridos N incorporaron significativamente más oleico en forma de FL y colesterol-éster (CE), pero menos en forma de TAG en comparación con los cíbridos OA (FL N $24,36 \pm 0,93$ vs OA $20,66 \pm 1,02$ $p \leq 0,05$; CE N $5,03 \pm 0,37$ vs OA $2,98 \pm 0,14$ $p \leq 0,0001$; TAG N $64,07 \pm 1,17$ vs OA $70,02 \pm 0,84$ $p \leq 0,0001$) (Figura 71 a).

Dado la importancia de los TAG en la formación de gotas lipídicas, se analizó la incorporación del ácido oleico en forma de TAG en función de los haplogrupos de ADNmt. Los resultados reflejaron que solamente los cíbridos OA-J tuvieron significativamente más incorporación de ácido oleico en forma de TAG que los cíbridos OA-H (TAG OA-J $71,58 \pm 0,49$ vs OA-H $66,91 \pm 0,05$ $p \leq 0,05$) (Figura 71 b).

En base a estos resultados, se analizó la formación y almacenaje de los ácidos grasos en forma de *LDs* mediante imágenes y citometría de flujo utilizando LD540. Para ello, la adición de ácido oleico en el medio de cultivo se utilizó como una estrategia para fomentar la formación de estas estructuras.

Objetivo 4



Objetivo 4

Figura 71 Distribución de ácidos grasos en el interior celular y formación de gotas lipídicas (*LDs*). **(a)** Patrones de distribución de ácidos grasos en cíbridos N y OA tras 24 h de incubación con [$1\text{-}^{14}\text{C}$]ácido oleico (N: verde claro; OA: verde oscuro). FL: fosfolípidos; DAG: diacilgliceroles; FFA: ácidos grasos libres; TAG: triacilglicéridos; CE: colesterol-éster. **(b)** Distribución lipídica en forma de TAG en cíbridos portadores de los haplogrupos H y J. **(c)** Imagen representativa de la formación de gotas lipídicas teñidas con LD540 (rojo) y Hoechst 33258 (azul-núcleos) en los cíbridos tras ser crecidos en presencia de $100\ \mu\text{M}$ de ácido oleico durante 48 h. **(d-e)** Cuantificación mediante citometría de flujo de la formación de gotas lipídicas en cíbridos N y OA **(d)** portadores de los haplogrupos de ADNmt H y J **(e)** tras ser crecidos en *DMEM* 4,5+P (basal) o *DMEM* ole. Los datos se representan como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes. * $p\leq 0,05$, *** $p\leq 0,001$ cíbridos N y OA. # $p\leq 0,05$ haplogrupos de ADNmt H y J. bbbb $p\leq 0,0001$ *DMEM* ole frente al basal (*DMEM* 4,5+P).

El análisis de los datos obtenidos reflejó que, cuando se crecen las células en presencia de este sustrato (*DMEM* ole), ambos tipos de cíbridos (N y OA) incrementan significativamente la formación de *LDs* comparado con la condición basal (*DMEM* 4,5+P), siendo los OA los que presentan una mayor cantidad de *LDs* frente a los N (N $1,90\pm 0,14$, OA $2,65\pm 0,26$ vs basal $1,00\pm 0,09$ $p\leq 0,0001$; N $1,90\pm 0,14$ vs OA $2,65\pm 0,26$ $p\leq 0,05$) (Figura 71 d). Cuando se realizó el mismo análisis pero en función de los haplogrupos de ADNmt H y J, los datos mostraron la misma tendencia descrita anteriormente, observándose un incremento de la formación de *LDs* en todos los grupos a estudio y siendo los cíbridos OA-J los que presentan un valor significativamente mayor frente a los N-J y los OA-H (N-H $2,00\pm 0,11$, N-J $1,89\pm 0,11$, OA-H $2,31\pm 0,14$, OA-J $2,89\pm 0,24$ vs basal $1,00\pm 0,11$ $p\leq 0,0001$; OA-J $2,89\pm 0,24$ vs N-J $1,89\pm 0,11$ $p\leq 0,05$; OA-J $2,89\pm 0,24$ vs OA-H $2,31\pm 0,14$ $p\leq 0,05$) (Figura 71 e).

5.2.1 Empleo del ácido oleico almacenado en el metabolismo celular: determinación de la lipólisis celular

La lipólisis celular consiste en la liberación de estos ácidos grasos acumulados para su posterior oxidación por la vía mitocondrial. En base a los resultados obtenidos anteriormente, se evaluó la capacidad lipolítica de los cíbridos con el objetivo de conocer si, además de ser capaces de incrementar el almacenamiento de ácidos grasos en forma de gotas lipídicas, son capaces también de utilizar estas estructuras como reservorios de energía.

Objetivo 4

El análisis de los datos obtenidos llevado a cabo entre los grupos de cíbridos N y OA reflejó que solamente existen diferencias significativas entre ambos grupos tras 8 h de medición, siendo los cíbridos N los que presentaron un perfil más lipolítico que los OA (N $10,21 \pm 0,85$ vs OA $6,43 \pm 1,30$ $p \leq 0,05$) (Figura 72 a). Por su parte, el análisis entre los haplogrupos de ADNmt no reflejó ninguna diferencia significativa en los grupos estudiados (Figura 72 b). Cabe destacar que en estas células a penas se vio incrementada la lipólisis durante las 24 h sin sustrato que duró el experimento.

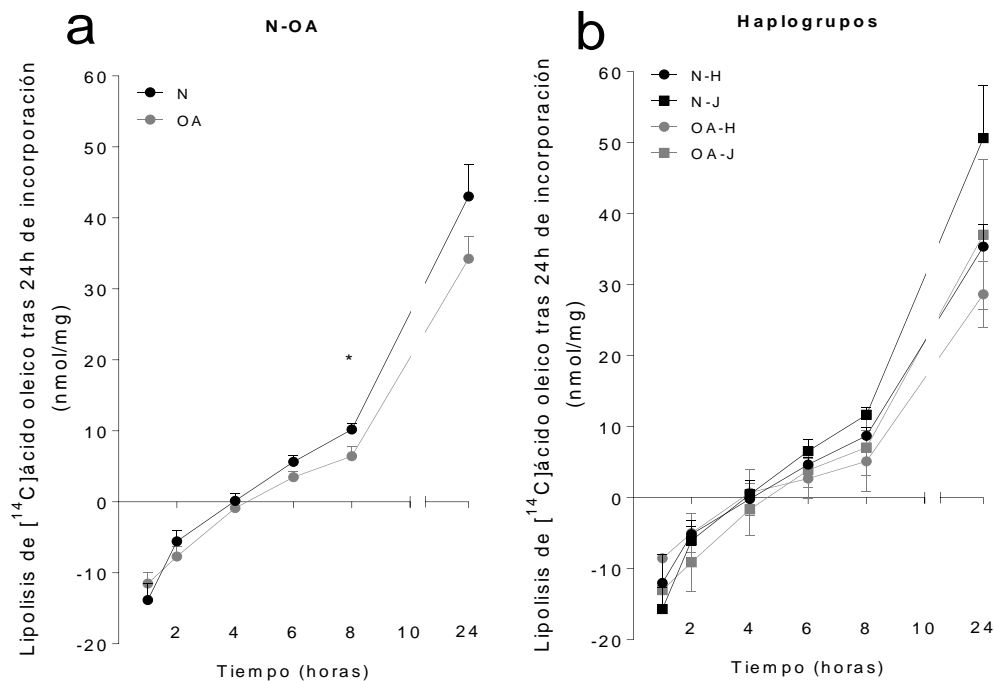


Figura 72 Determinación de la lipólisis tras 24 h de cultivo sin sustrato marcado radioactivamente. Cíbridos N y OA (**a**) y haplogrupos de ADNmt H y J (**b**). Los datos se representan como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ cíbridos N y OA. # haplogrupos de ADNmt H y J.

Objetivo 4

El metabolismo celular juega un papel fundamental en el estudio de mecanismos moleculares que puedan dar lugar al origen de una enfermedad. Hoy en día sabemos que la OA es una enfermedad que conlleva un aumento del estrés oxidativo y de la muerte celular, ambos relacionados con procesos de disfunción mitocondrial, menor producción de ATP, fragmentación de la masa mitocondrial y con una peor respuesta a estímulos característicos de la enfermedad, como un bajo grado de inflamación crónica (80, 86, 88, 125, 192, 227).

A pesar de que el estudio de estos procesos celulares en la OA ha avanzado mucho en los últimos años, todavía se desconoce cómo se desencadenan estos cambios a nivel molecular. No obstante, se ha descrito que el metabolismo está implicado en la patogénesis de la OA, donde el metabolismo de los condrocitos artrósicos está alterado facilitando la producción de factores anti-anabólicos, pro-catabólicos e inflamatorios (91).

Bajo este escenario, la mitocondria tiene una función central, por lo que los resultados obtenidos en el desarrollo de este objetivo ayudan a entender mejor el estatus metabólico celular y la implicación de la función mitocondrial en la OA.

El estudio del metabolismo de la glucosa en los híbridos transmitocondriales, generados utilizando plaquetas de donantes N y OA portadores de los haplogrupos de ADNmt H y J, se abordó desde varios enfoques permitiendo analizar tanto el consumo celular de la glucosa presente en el medio de cultivo, la capacidad glucolítica mediante el análisis de la ECAR, así como el metabolismo siguiendo la glucosa marcada radioactivamente, lo que nos permitió tener una visión global del mismo en este modelo celular.

Objetivo 4

Tras estos análisis, se observó que los híbridos OA tuvieron menor glucólisis determinada por la *ECAR* que los N. Sin embargo, mostraron un incremento del consumo de glucosa y, a pesar de que no se observaron diferencias en la producción de lactato, el ratio obtenido entre ambos parámetros fue más bajo. Con este dato, junto con que parecen tener una menor actividad LDH, cabría esperar una diferente producción de piruvato entre ambos grupos, no obstante, no se observaron estas diferencias entre los dos tipos de híbridos (N y OA). Estos resultados, lejos de ser contradictorios, apuntan a una misma dirección mostrando que posiblemente los híbridos N presenten un metabolismo más glucolítico. Esto es debido a que, como se describió anteriormente, el aumento de la glucólisis junto con el desacoplamiento de la función mitocondrial, implica un incremento de la acumulación del piruvato en el citoplasma lo que favorece la producción de lactato por parte de la enzima LDH (228). Este sustrato producido provoca la acidificación del medio extracelular, parámetro que se puede medir mediante la *ECAR* y que se vio incrementado en estas células en la primera parte de este objetivo. En segundo lugar, es posible que los híbridos OA, por su parte, incorporen mayor cantidad de glucosa con el objetivo de dirigir este sustrato a la mitocondria y compensar el daño en su función.

Teniendo en cuenta la posibilidad de que el piruvato formado mediante la glucólisis sea transportado rápidamente al interior mitocondrial en los híbridos OA, quedando retenido en su interior, y que la lisis celular realizada durante el protocolo no llegase a romper la mitocondria, es probable que el contenido total de piruvato no se liberara al extracto utilizado para medir su concentración, por lo que el resultado no sea un reflejo fiel de lo que está pasando en el modelo celular.

El piruvato entra a la mitocondria a través del complejo MPC (*mitochondrial pyruvate Carrier 1 (MPC1)* y *MPC2*), pero está descrito en la literatura que *MPC2* actúa como un transportador de piruvato autónomo y no depende de *MPC1* para ejercer su función (229), por lo que en este trabajo se analizó el nivel de expresión

Objetivo 4

génica solo de esta subunidad. Los datos reflejaron una expresión génica *MPC2* menor en los cíbridos OA, lo que podría ser indicativo de una peor respuesta metabólica que puede afectar a la respuesta bioenergética, como recientemente se ha descrito en un modelo de Alzheimer (230). Teniendo en cuenta que se ha descrito que *MPC2* media en la disfunción mitocondrial (231), resulta interesante poder determinar el significado real de este parámetro en nuestro modelo celular, por lo que sería necesario profundizar en su estudio mediante el empleo de otras técnicas en el futuro.

Todos estos datos apuntan a una misma dirección, mostrando que el metabolismo de los cíbridos OA está alterado, puesto que presentan un fenotipo menos glucolítico obteniendo la mayor parte de energía vía mitocondrial.

Como se ha visto anteriormente, la concentración de glucosa puede afectar el metabolismo de las células y cada vez son más los investigadores que prefieren utilizar una concentración de glucosa más baja a la hora de realizar experimentos *in vitro*, ya que una concentración 4,5 gr/L equivaldría a una persona diabética con una alta exposición de azúcar en sangre, siendo una concentración útil únicamente en modelos de diabetes (232-234). A lo largo del desarrollo de este trabajo de tesis doctoral, se han analizado diferentes parámetros relacionados con la función celular y mitocondrial bajo dos concentraciones de glucosa, una más estándar a nivel del laboratorio pero también considerada hiperglicemia (*DMEM* 4,5) y otra cada vez más ampliamente utilizada, ya que se considera una concentración más parecida al entorno fisiológico de una célula en el cuerpo humano (*DMEM* 1), poniendo de relevancia diferencias existentes entre los diferentes grupos de cíbridos. No obstante, a la hora de estudiar parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa, solamente observamos diferencias entre los cíbridos N y OA cuando estos se crecieron en una alta concentración de glucosa. Una posible explicación podría ser que los cíbridos OA presentan una respuesta similar que los condrocitos OA debido a que la disfunción mitocondrial que presentan incrementa

Objetivo 4

la demanda metabólica y energética, y modula parámetros/rutas citoplasmáticas para satisfacer el requerimiento celular. Así, como se describió anteriormente en condrocitos OA, al aumentar la concentración de glucosa en el exterior celular, estos no son capaces de regular los niveles de expresión de los transportadores de glucosa, por lo que el consumo y la oxidación de este sustrato se ve incrementado lo que presenta una serie de complicaciones a nivel de estrés oxidativo y muerte celular (113, 179). Los datos obtenidos en este objetivo siguen esta misma línea, ya que se observó que cuando los cíbridos se crecieron a una baja concentración de glucosa no se observaron diferencias entre los grupos, sin embargo, al ser crecidos en altas concentraciones de este sustrato, los cíbridos OA presentaron un mayor consumo y oxidación de glucosa, además de un incremento en la expresión génica de *SLC2A1*.

Con el objetivo de estudiar el metabolismo de los cíbridos desde un punto de vista más próximo a lo que ocurre a nivel fisiológico, se estudiaron las diferencias existentes en el metabolismo basal entre cíbridos N y OA utilizando dos de los sustratos más importantes en el metabolismo celular para obtener energía, glucosa y ácido oleico. De esta manera, como se vio anteriormente a la hora de analizar el metabolismo basal de la glucosa a una baja concentración, no se observaron diferencias entre ambos grupos. Sin embargo, al analizar los datos obtenidos del metabolismo basal del ácido oleico, los cíbridos OA mostraron una menor producción de ASM que los N. A pesar de que hoy en día se conoce que la glucosa es una de las principales fuentes de energía en los condrocitos, se ha demostrado que los lípidos también forman parte del metabolismo de estas células siendo necesarios tanto para la obtención de energía como a nivel estructural y de señalización (91, 213). Los niveles de producción de metabolitos solubles se consideran una medida directa la oxidación incompleta, esto es debido a que no todos los carbonos de los ácidos grasos de cadena larga se oxidan hasta Acetil-CoA, por lo que la molécula resultante, liberada al exterior celular, se puede analizar en

Objetivo 4

el medio de cultivo (235). Los niveles bajos de este parámetro se pueden asociar con un menor consumo total del ácido oleico observado también en los cíbridos OA, no obstante, una menor producción de *ASM* también se asocia con una función mitocondrial menos eficiente (220), dato que concuerda con lo observado en el análisis del parámetro de la eficiencia de la β -oxidación, donde los cíbridos OA presentaron un menor ratio entre la producción de metabolitos intermedios y la oxidación completa.

A la hora de analizar las diferencias entre los haplogrupos de ADNmt H y J en el metabolismo basal de la glucosa, se observó que los cíbridos OA-J presentan mayores niveles de glucosa asociada a la célula y también tienden a oxidar más este sustrato. Además, en el caso del análisis del metabolismo basal de los ácidos grasos, se observó que los cíbridos N-J oxidan menos ácido oleico y presentan mayor eficiencia de este proceso que los N-H, sin embargo, no se observaron diferencias en este parámetro en los cíbridos OA. En conjunto, estos datos reflejan que el haplogrupo de ADNmt J favorece un comportamiento celular más glucolítico que el haplogrupo de ADNmt H. Esta afirmación podría ser resultado del característico perfil bioenergético descrito en cíbridos portadores de este haplogrupo de ADNmt, donde de acuerdo con datos de estudios previos, se observó que este tipo de cíbridos son capaces de incrementar la viabilidad celular aumentando la glucolisis y disminuyendo la producción de ATP y ROS (80, 101, 122, 128).

Como se ha descrito anteriormente, la glucosa y los ácidos grasos son dos de los principales sustratos que utiliza una célula para obtener energía (197, 200). Con los resultados obtenidos a nivel basal, se realizó un análisis comparativo entre el metabolismo de la glucosa y del ácido oleico y se observó que ambos tipos de cíbridos presentan un metabolismo principalmente glucolítico, ya que prefieren oxidar la glucosa por encima del ácido oleico. Este dato concuerda con lo descrito en condrocitos, células que se consideran mayormente glucolíticas a pesar de que

Objetivo 4

hoy en día se sabe que los condrocitos obtienen hasta un 25% de energía a través de la mitocondria (81, 182, 236).

Con el objetivo de profundizar en este resultado, se cultivaron las células en presencia de glucosa y ácido oleico simultáneamente. De esta manera se estudió el efecto de los ácidos grasos en el metabolismo glucolítico de los cíbridos y se observó que los cíbridos OA presentan un comportamiento diferente de los cíbridos N, los cuales fueron capaces de incrementar el metabolismo glucolítico aun en presencia de ácido oleico. Este resultado se confirmó al analizar los datos obtenidos del metabolismo de la glucosa inhibiendo el metabolismo del ácido oleico con etomoxir. En este caso, de nuevo los cíbridos N, pero no los OA, fueron capaces de compensar la inhibición del metabolismo lipídico, incrementando los niveles de los parámetros estudiados en el metabolismo de la glucosa manteniendo un perfil glucolítico. En contraste, al analizar los datos obtenidos del metabolismo de los ácidos grasos, inhibiendo el metabolismo de la glucosa con UK5099, se observó un incremento de los parámetros analizados solamente en los cíbridos OA, lo que sugiere una preferencia por el metabolismo del ácido oleico. Estos datos ponen de manifiesto que los cíbridos portadores de mitocondrias de pacientes con OA no son capaces de adaptar su metabolismo glucolítico frente a cambios en las condiciones energéticas, desenmascarando un desequilibrio en la función mitocondrial que favorece la oxidación de ácidos grasos. Además, como se describió anteriormente en el objetivo 3, la producción de O_2^- depende directamente de la correcta función mitocondrial proporcionándonos un marcador de estrés oxidativo mitocondrial. Así, siguiendo la misma línea de resultados, los cíbridos OA presentaron un incremento de la producción de ROS mitocondrial cuando se incubaron las células en presencia de ambos sustratos en comparación con los N, reflejando que la inadaptabilidad metabólica incrementó el estado de estrés celular a nivel de este orgánulo. En este sentido, en la literatura aparece descrito que la disfunción mitocondrial y el consecuente desequilibrio en el

Objetivo 4

cometido de la mitocondria en el metabolismo celular favorece la oxidación de los ácidos grasos e incrementa el estrés oxidativo. (189, 237-239). En concreto, Aduano y colaboradores describieron que la inducción de la disfunción mitocondrial en una línea celular de neuroblastos indujo un cambio en el metabolismo celular a favor del incremento de la β -oxidación de ácidos grasos (237), por lo que es posible que en nuestro caso estos resultados se deban a la disfunción mitocondrial que presentan los cíbridos OA desde su generación y que previamente se ha relacionado el desarrollo de la OA y el daño celular en condrocitos (80, 125, 227).

Uno de los mecanismos de respuesta de la mitocondria frente a un incremento del estrés oxidativo es la regulación de la dinámica mitocondrial y la mitofagia (26). Por ello, tras observar que la presencia del UK5099 elevaba los niveles de producción de ROS en ambos tipos de cíbridos, decidimos estudiar la dinámica mitocondrial mediante la expresión génica de enzimas implicadas en los procesos de fusión y fisión de la membrana mitocondrial.

Hoy en día se conoce que a un exceso de nutrientes y/o la disfunción del metabolismo celular provoca la fisión de la membrana mitocondrial que genera una red mitocondrial fragmentada y reduce la eficiencia energética, aumentando la producción de ROS y favoreciendo la eliminación de mitocondrias mediante mitofagia (19, 159, 206). Al contrario, tras un proceso de fusión mitocondrial, la red mitocondrial es tubular y fusiforme y se favorece la viabilidad celular incrementando la producción de ATP, la tasa de respiración y mejorando la homeostasis del calcio (200, 205). En concreto, MFN2 media en la fusión entre membranas mitocondriales estableciendo interacciones con otras proteínas y generando una red mitocondrial conectada y tubular. Por su parte, la fisión mitocondrial se origina por FIS1, que es una proteína situada en la membrana externa mitocondrial que reconoce la proteína encargada de la escisión de la membrana mitocondrial *dynamic-related protein 1* (DRP1) (205, 206, 240). Un correcto balance entre los procesos de fusión y fisión mitocondrial permiten que la

Objetivo 4

célula sea capaz de adaptarse a los requerimientos nutricionales en cada momento, regulados por un conjunto de proteínas que median en la remodelación de las membranas externa e interna de la mitocondria (26, 207).

En el caso de los cíbridos, los resultados obtenidos en los niveles de expresión de estas enzimas implicadas en la dinámica mitocondrial reflejaron que, a pesar de que ambos tipos de cíbridos presentan niveles de expresión de *FIS1* disminuidos, solamente los cíbridos N y no los OA mostraron una respuesta adaptativa, incrementando la expresión génica de *MFN2* frente a la elevación de los niveles de producción de ROS en presencia de UK5099. Cabe destacar este resultado porque, aunque se ha descrito que el equilibrio entre los procesos de fisión y fusión mitocondrial regulan la eliminación de mitocondrias dañadas, también se ha detallado el papel que juega este proceso mediante otra vías como la estabilización de PINK en la membrana externa de la mitocondria y el reclutamiento de PARKIN desde el citoplasma hasta la mitocondria, para iniciar la mitofagia (157, 159, 206). En este caso, es posible que los cíbridos N recluten Parkin mediante el incremento de *MFN2* en la membrana externa, como respuesta a un incremento del estrés oxidativo, logrando eliminar las mitocondrias dañadas o disfuncionales por la vía Pink/Parkin independientemente de la dinámica mitocondrial y los ciclos de fusión y fisión (206). Estudios previos donde se ha descrito que las células originadas de la línea parental de osteosarcoma 143B.TK⁻ presentaron niveles de proteína de *MFN2* elevados siguen la misma línea de estos datos, ya que se mostró que puede jugar un papel relevante en la respuesta al estrés celular, debido a que su sobreexpresión tiene una función protectora en cuanto a la función mitocondrial, reestableciendo quizá parcialmente el daño metabólico en células con ADNmt dañado (241, 242). Esto ocurre por el característico metabolismo de las células tumorales (efecto Warburg) que al ser células mayormente glucolíticas, presentan de por sí un sistema respiratorio aberrante que genera un exceso de

Objetivo 4

producción de ROS a nivel mitocondrial, por lo que constan con sistemas de respuesta a estrés oxidativo más eficientes que otros tipos celulares (243).

A la hora de estudiar el metabolismo de un sustrato no todo se centra en cómo se oxida el mismo, sino que también es necesario tener en cuenta de qué manera se incorpora a las estructuras celulares o si se acumula en estructuras de almacenamiento. Por ello, el último paso de este trabajo se centró principalmente en estudiar la incorporación y acumulación de la glucosa y el ácido oleico en el interior celular.

Una de las principales estructuras de reserva energética que se forma a partir de la glucosa es el glucógeno y el análisis de este compuesto en el modelo celular bajo diferentes medios de cultivo no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos a estudio. En este caso, se esperaría que, con el aumento de la concentración de la glucosa, las células incorporaran más este sustrato en forma de reserva energética. Sin embargo, es posible que en presencia de una elevada concentración de glucosa utilicen este sustrato en otras vías celulares, como la glicosilación de proteínas, proceso que se describió recientemente en condrocitos y que se ha asociado al envejecimiento y a la destrucción del cartílago (244-247). De todos modos, es importante resaltar que quizá la metodología utilizada (tinción y microscopía) en el desarrollo de este objetivo no sea la más indicada para observar estas diferencias, por lo que sería interesante profundizar en el estudio de este parámetro mediante técnicas que nos permitan estudiar el perfil de glucosaminoglicanos y otras moléculas asociadas al metabolismo de la glucosa.

Tras el análisis de todos estos resultados, se observó que los híbridos OA presentan mayor afinidad por el metabolismo de los ácidos grasos que los N, por lo que resultó interesante estudiar la distribución de los lípidos en la célula. Los resultados obtenidos reflejaron un patrón de distribución diferente entre ambos tipos de híbridos. Así, los híbridos OA mostraron menor acumulación de ácido oleico en forma de fosfolípidos y de colesterol-éster en comparación con los N.

Objetivo 4

No obstante, este sustrato se incorporó en mayor medida en forma de triacilglicerol en los cíbridos OA, que también mostraron una mayor formación de gotas lipídicas en comparación con los N. Previamente en la literatura se ha descrito que los ácidos grasos se pueden incorporar en el cartílago y en los condrocitos en forma de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y triacilglicéridos (212, 214, 248, 249). Los fosfolípidos se consideran importantes para el mantenimiento normal del cartílago y los triacilgliceroles dirigen el almacenamiento de los ácidos grasos en forma de gota lipídica (213). Hoy en día, se ha descrito que el almacenamiento de lípidos en forma de gotas lipídicas podría actuar como una respuesta adaptativa frente a un posible incremento de toxicidad por la acumulación de ácidos grasos en el interior celular, además de funcionar como reservorios de energía sin afectar al estado redox de la célula (209, 250). De todos los datos obtenidos en relación al almacenamiento de los lípidos en el interior celular, observamos que los cíbridos OA y, en concreto, los portadores del haplogrupo de ADNmt J, tuvieron una mayor incorporación de ácido oleico en forma de triacilgliceroles, así como mayor formación de gotas lipídicas. No obstante, no se observaron diferencias en la lipólisis. Estos resultados apoyan la hipótesis de que este haplogrupo de ADNmt confiere protección frente al desarrollo de la OA en aquellos sujetos que lo portan, donde, como se ha explicado anteriormente, una alteración del metabolismo lipídico podría ser un factor de riesgo en esta patología (101, 210, 214). Actualmente, estudios poblacionales previos han puesto de manifiesto la relación existente entre el haplogrupo de ADNmt J y la OA mostrando que esta configuración de *SNPs* protege frente a la incidencia y progresión de esta patología a nivel de la rodilla y la cadera (98, 100, 123, 251). A pesar de que hoy en día todavía es necesario estudiar y profundizar a nivel molecular la relación entre este haplogrupo de ADNmt y la protección en la OA, resulta interesante destacar la posibilidad de que los cíbridos N-J y OA-J almacenen una mayor cantidad de ácidos grasos en gotas lipídicas, quizá con el objetivo de proteger frente al desequilibrio del metabolismo de los ácidos grasos

Objetivo 4

como un mecanismo de respuesta protector frente a la incidencia y progresión de la OA.

Todos estos datos demuestran que los cíbridos originados de donantes OA se comportan de una manera diferente en comparación con los N. En concreto, cabe resaltar la baja capacidad metabólica mitocondrial que presentan teniendo en cuenta que se trata de células mayormente glucolíticas. Esto sigue la misma línea descrita en la literatura, donde se resalta la capacidad metabólica de reparación y regeneración del cartílago en fases iniciales de la enfermedad y la pérdida de esta flexibilidad metabólica en fases más tardías (91). A pesar de todo ello, durante los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio de la patología artrósica a nivel molecular, sin embargo, el análisis de la flexibilidad metabólica y sus consecuencias en relación a esta enfermedad todavía se encuentra en sus fases iniciales de estudio, por lo que es necesario profundizar en el empleo de nuevas técnicas que nos permitan incrementar el conocimiento en esta área.

OBJETIVO 5

Proteoma de los cíbridos con marcaje isotópico para
cuantificación relativa y absoluta (*iTRAQ*).

Objetivo 5

La mitocondria es un orgánulo celular que presenta su propio ADN formado por un conjunto de 37 genes. De estos genes solamente 13 codifican para proteínas que se encuentran mayormente implicadas en el transporte electrónico y en la fosforilación oxidativa. Hoy en día se ha descrito que el proteoma mitocondrial se origina a partir de los dos ADN celulares (ADNn y ADNmt), así, en la mitocondria se encuentran alrededor de 1500 proteínas codificadas por el genoma nuclear que se asocian con actividad mitocondrial y son necesarias para el correcto funcionamiento de este orgánulo (252).

Los modelos de células *Rho-0* han sido de gran ayuda a la hora de evaluar las diferencias de la expresión proteica en una línea celular carente de ADNmt estudiando en mayor profundidad la implicación/efecto de la mitocondria en el proteoma celular (252, 253). Asimismo, los análisis proteómicos comparativos entre híbridos parecen ser útiles a la hora de examinar de manera tanto cuantitativa como cualitativa el efecto que el proteoma mitocondrial puede inducir en el proteoma celular total (bien debido a una mutación en el ADNmt, o a la propia perturbación metabólica que un genoma mitocondrial completo externo puede inducir) (254).

El proteoma de una célula, a diferencia del genoma, es un sistema dinámico que varía en función del estado de la propia célula. De este modo, la regulación de su expresión y correcto funcionamiento dependen de la activación o silenciamiento de genes, de la epigenética, del procesamiento, síntesis y plegamiento de la propia información generada por el genoma, o incluso de los cambios postraduccionales que tengan lugar una vez sintetizada la proteína. El objetivo final es originar una respuesta celular adecuada y adaptada al entorno fisiológico de la célula (255, 256).

Objetivo 5

Por ello, dentro de una célula, el proteoma constituye la última barrera de actuación frente a estímulos o a condiciones estresantes, siendo por tanto las proteínas las encargadas de llevar a cabo la función final cuando se genera una respuesta a nivel genético.

La proteómica consiste en el estudio de las proteínas expresadas por un organismo bajo un entorno concreto. Las técnicas proteómicas se han desarrollado en los últimos años con el objetivo de, no sólo identificar el conjunto de proteínas que forman el proteoma de un organismo, sino también con el fin de llegar a comprender la función que desempeñan dentro de su metabolismo y analizar de manera comparativa la variación del proteoma bajo diferentes condiciones fisiológicas (257). Una de las técnicas más utilizadas en el estudio de las proteínas es la espectrometría de masas (MS) ya que permite conocer cambios en el proteoma celular a nivel de alteraciones estructurales, como el plegamiento y la estabilidad, en la agregación o incluso en la interacción con otras proteínas (258, 259). Pese a ello, este tipo de técnicas presentan limitaciones. Una de ellas es que se obtienen largas listas de proteínas que pueden o no estar expresadas diferencialmente entre dos condiciones, pero que finalmente carecen de un sentido biológico funcional. Por ello, en los ensayos proteómicos es necesario un análisis posterior tras el procesado de las muestras y la adquisición de los datos. Esto proporciona la posibilidad de estudiar la función biológica real en la célula mediante aproximaciones bioinformáticas, favoreciendo una mejor interpretación de los datos y los procesos biológicos en los que están implicados (255-257).

El empleo de técnicas proteómicas constituye una herramienta eficaz a la hora de estudiar un amplio conjunto de proteínas al mismo tiempo, siendo la proteómica comparativa uno de los abordajes más interesantes del estudio del proteoma celular. Este tipo de análisis comparativo permite identificar proteínas presentes en una o varias muestras bajo diferentes condiciones y, al mismo tiempo,

Objetivo 5

cuantificar o bien, de manera absoluta, o bien, de manera relativa frente una condición control, la abundancia inducida por un proceso biológico determinado.

Gracias al avance de los últimos años, hoy en día disponemos de una tecnología de marcaje con isótopos para cuantificación relativa o absoluta (*Isotope Tagged Relative and Absolute Quantification- iTRAQ*) que permite marcar un total de 8 muestras y analizarlas simultáneamente. En comparación con otros métodos, este tipo de marcaje ofrece un mayor rendimiento de las muestras, ya que se realiza tras haber digerido las proteínas y, además, proporciona la posibilidad de disminuir el tiempo de adquisición de datos, analizando hasta un conjunto de 8 condiciones diferentes al mismo tiempo (260).

Como se ha demostrado a lo largo del desarrollo de este trabajo de tesis, el ADNmt que proviene de pacientes con OA (o que presenta un haplogrupo de ADNmt determinado) parece jugar un papel importante en la función celular, presentando diferente capacidad de respuesta frente a diferentes estímulos, así como en la modulación metabólica al compararlo con el ADNmt de donantes N. Por ello, el objetivo de este capítulo se basa en identificar, caracterizar funcionalmente y analizar la expresión diferencial de un conjunto de proteínas obtenidas a partir de híbridos N y OA portadores del haplogrupo de ADNmt H o J mediante el empleo de técnicas proteómicas comparativas basadas en la MS.

Objetivo 5

El proteoma de los cíbridos mitocondriales se estudió en 8 cíbridos diferentes originados a partir de 8 donantes, 4 N y 4 OA, portadores de los haplogrupos H o J (Figura 73).

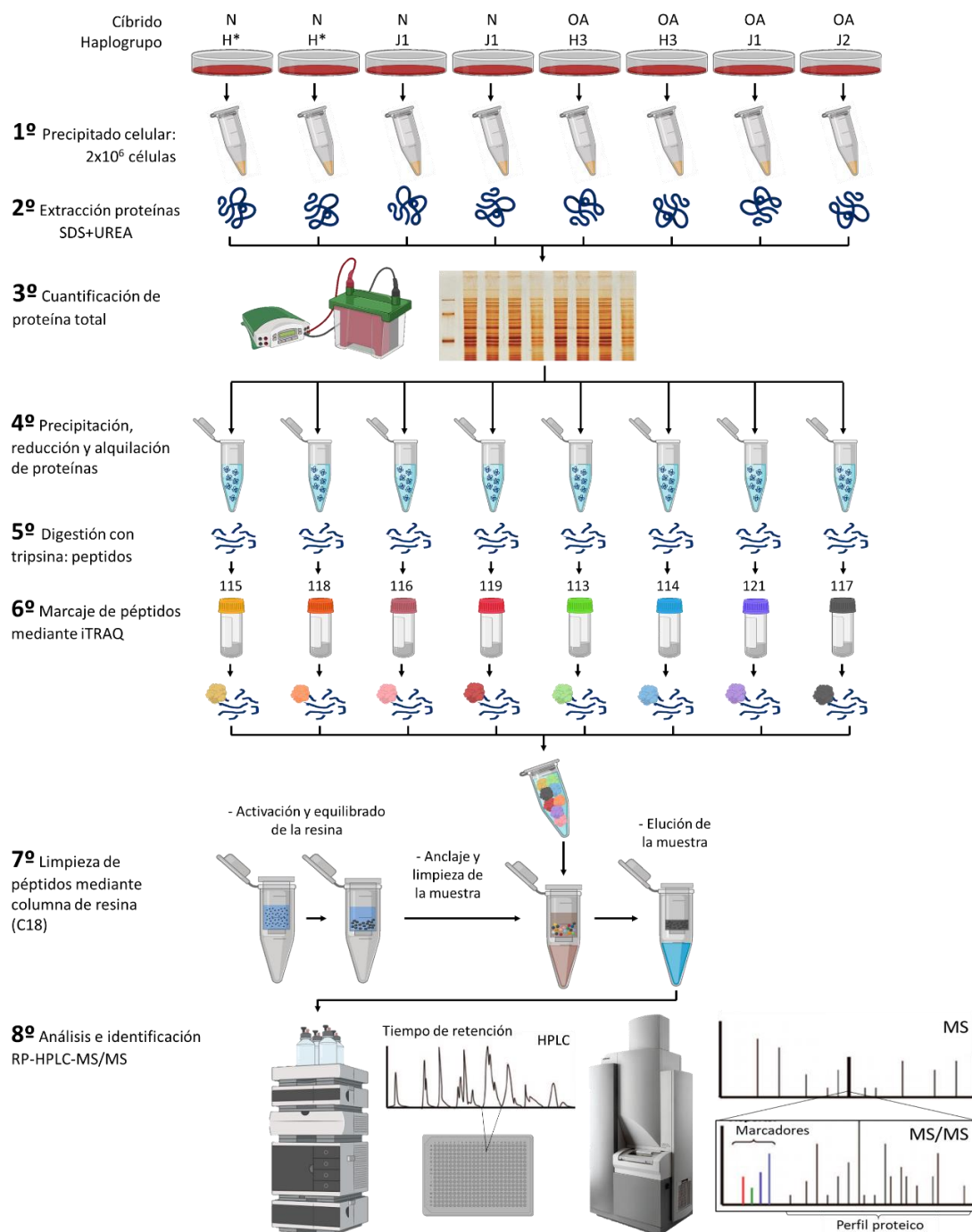


Figura 73 Flujo de trabajo seguido para el marcaje *iTRAQ* de los cíbridos.

Objetivo 5

1.- Extracción y separación de proteínas a partir de un extracto celular mediante técnicas basadas en gel

Del mismo modo en el que se describió anteriormente en el material y métodos del Objetivo 3 en el apartado 3.1, la extracción de proteínas se llevó cabo utilizando un tampón de lisis celular (urea a una concentración de 6M y SDS al 2%) que favorece la lisis celular y la liberación de las proteínas al medio extracelular.

Para ello, se tripsinizaron y recogieron un total de 2×10^6 células de una placa de 100 mm² en DMEM 4,5 +P, y se obtuvo un precipitado celular mediante una centrifugación a 1500 rpm durante 10 min. A continuación, este precipitado se lavó con solución salina isotónica tres veces mediante centrifugaciones de 1500 rpm durante 10 min y se añadió 100 µl de tampón de lisis. Finalmente, las muestras se lisaron aplicando vórtex y una sonicación de 3 min y se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se almacenaron a -20°C.

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante BCA (Objetivo 3 en el apartado 3.1) y se comprobó la exactitud de la cuantificación, así como la integridad de la muestra mediante el empleo de técnicas basadas en gel y la realización de una tinción de plata para llevar a cabo una densitometría. En este caso, se preparó un gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida) de 1 mm de grosor que consistió en:

- **Gel concentrador compuesto por:** 4% de acrilamida/poliacrilamida (Sigma-Aldrich), 375 µl de TRIS a una concentración de 2 M pH=6,8, 30 µl de SDS al 10%, 5 µl/ml de persulfato amónico (PSA) a una concentración de 20% para iniciar la reacción de polimerización y 1 µl/ml de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) que cataliza esta reacción y H₂O hasta completar un volumen final de 1,5 ml.

Objetivo 5

- **Gel separador compuesto por:** 10% de acrilamida/poliacrilamida (Sigma-Aldrich), 1,88 ml de TRIS a una concentración de 2M y pH=8,8, 100 µl de SDS al 10%, 12,5 µl de PSA al 20%, 6 µl de TEMED y H₂O hasta completar un volumen final de 10 ml.

Una vez polimerizado el gel, a cada 5 µl muestra se le añadió 1 µl de H₂O y 2 µl de tampón de carga (4×laemmli *Sample buffer solution* (Bio-Rad, Hercules)) con β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y se desnaturalizaron a 100°C durante 5 min. Finalmente, se montó el gel en la cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis (0,25 M Tris-Base, 1,92 M glicina, 1% SDS y H₂O hasta 1 L), se cargaron las muestras junto con un marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standars* (BioRad) y se corrió durante 60 min a 100 voltios.

2.- Cuantificación de proteínas mediante tinción de plata y densitometría

La tinción del gel de poliacrilamida permite la visualización del perfil proteico de cada una de las muestras y, por tanto, su cuantificación aproximada. En este trabajo se realizó un protocolo de tinción de plata modificado de Rabilloud 1992 (261) debido a que la sensibilidad de esta tinción se corresponde con 1 ng de proteína.

Una vez que se han separado las proteínas en el gel de poliacrilamida, se fijaron en tampón fijador (40% de etanol, 10% de acético glacial (Sigma-Aldrich) y 50% H₂O destilada) durante dos periodos de 20 min. Tras dos lavados de 10 min con H₂O destilada, se incubó con tampón sensibilizador (0,02% de tiosulfato sódico (NaTio) (Sigma-Aldrich)) durante 1 min. De nuevo, se lavó dos veces en H₂O destilada durante 1 min y se tiñó con reactivo de plata (0,2% de nitrato de plata (AgNO₃) (Sigma-Aldrich) en 0,075% de formalina (Sigma-Aldrich)). A continuación, se lavó durante 10 seg con H₂O destilada y se reveló el gel durante un máximo de 10 min

Objetivo 5

en presencia de carbonato potásico (Na_2CO_3) al 3% (Sigma-Aldrich), 0,025% de formalina y 12,5 mg/L de NaTio. Una vez que las bandas se tiñeron, se paró el revelado con 3% de Tris-base en acético glacial al 10% durante 30 min y finalmente se lavó en H_2O destilada durante 10 min.

La imagen del gel se obtuvo con el escáner *Microtek's Bio-6000* (Microtek). La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo mediante el empleo del software *ImageQuant 5.2* (GE Healthcare Life Sciences) con el que se corrigió el fondo de la imagen y se seleccionaron los valores absolutos de cada columna correspondiente a cada una de las muestras analizadas.

3.- Preparación y marcaje de proteínas mediante isótopos estables: marcaje *iTRAQ*

La metodología de marcaje mediante *iTRAQ* se desarrolló con el objetivo de poder etiquetar, identificar y cuantificar las proteínas de una misma muestra hasta un total de 8 muestras diferentes en un mismo ensayo. La peculiaridad de cada uno de estos 8 marcadores se corresponde con que, en el espectro de masas todas las muestras presentan una misma masa total gracias al grupo compensador. Sin embargo, tras la fragmentación (*MS/MS*), esta región se libera dando paso a la cuantificación del grupo reportero, cuyo peso molecular difiere en cada una de las ocho versiones reflejando picos con una masa/carga (m/z) conocida, en este caso: 113; 114; 115; 116; 117; 118; 119 y 121 para cada una de las muestras (Figura 73).

Para llevar a cabo el protocolo de marcaje se utilizó el kit *iTRAQ® reagents multiplex* (Sciex) donde, por recomendación del fabricante, se necesitó realizar una previa preparación de las muestras que consistió en:

1. **Precipitación:** una vez cuantificada la proteína se precipitaron 20 μg de cada extracto con acetona fría durante toda la noche. Finalmente, se

Objetivo 5

centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min a 4°C y se dejó secar el precipitado proteico.

2. **Reducción y alquilación de cisteína:** a cada una de las muestras se añadió: 20 µl de tampón de disolución, 1 µl de desnaturalizante y 2 µl de reactivo reductor, se mezcló y disolvió mediante agitación y sonicación, y se incubó durante 60 min a 60°C. Finalmente, se bloqueó la cisteína con 1 µl del reactivo bloqueante de este aminoácido durante 10 min.
3. **Digestión de la muestra con tripsina:** cada muestra se mezcló con 10 µl de tripsina (0,1 µg/ µl) (1:20 enzima:sustrato) y se incubó durante toda la noche a 37°C.
4. **Marcaje de los péptidos con los reactivos iTRAQ:** cada uno de los 8 marcadores se reconstituyó con 70 µl de isopropanol y se añadieron a cada una de las 8 muestras. Tras mezclarlo, se incubó durante 2 h a TA y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. Finalmente, los 8 sobrenadantes se mezclaron en un mismo tubo y se evaporó con *SpeedVac™ Concentrators* (Thermo Fisher Scientific), obteniendo un conjunto de 8 muestras diferentes con un marcaje específico cada una.

4.- Limpieza y separación de péptidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa

Antes de realizar la cuantificación del perfil proteico de las muestras mediante el empleo MS se realizó una limpieza del conjunto de muestras con el objetivo de eliminar componentes salinos que podrían interferir posteriormente. Asimismo, debido a la complejidad de la muestra (8 proteomas de 8 líneas celulares diferentes de híbridos mitocondriales), se consideró necesario realizar una separación de la muestra en diferentes fracciones aplicando técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa (*reverse phase- high performance liquid chromatography-RP-HPLC*).

Objetivo 5

4.1 Limpieza de las muestras mediante columnas de resina C18

Para llevar a cabo la limpieza de sales en la muestra se utilizó el kit *PepClean™ C-18 Spin Columns* (Thermo Fisher Scientific), que permite purificar y concentrar el conjunto de péptidos de la muestra sin interferir en técnicas posteriores de MS. Siguiendo las instrucciones del fabricante, la resina que contiene la columna se activó y equilibró añadiendo, en primer lugar, 100 µl de acetonitrilo (ACN) al 50% que se eliminó mediante centrifugación a 15000 rpm durante 1 min y, en segundo lugar, añadiendo 200 µl de ACN al 5% mezclado con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5%, que se eliminó por centrifugación. A continuación, se resuspendió la muestra en 25 µl de TFA al 0,1% y añadió a la columna. Una vez que las proteínas quedaron retenidas en la resina, se procedió con 4 lavados de ACN al 5% mezclado con TFA al 0,5% añadiendo 200 µl y eliminando por centrifugación. Finalmente, la muestra se recuperó mediante elución en 20 µl de ACN al 80% mezclado con TFA al 0,1% y se evaporó con *SpeedVac™ Concentrators*.

4.2 Separación de proteínas mediante cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa (RP-HPLC)

La cromatografía líquida de fase reversa tiene como principal característica la separación de compuestos en función de su polaridad. Esto es debido a que la fase estacionaria de la cromatografía es apolar, compuesta principalmente por partículas de sílice modificadas, y la fase móvil es polar, normalmente H₂O/ACN. Esto permite que, mediante la variación de la concentración de la fase móvil, se retengan diferentes componentes de la muestra durante diferentes tiempos, separando la muestra en fracciones que pueden ser recuperadas en diferentes tubos lo que, finalmente, simplifica la complejidad de la muestra.

Para llevar a cabo la separación cromatográfica, la muestra se reconstituyó en 140 µl de fase móvil compuesta por 5% de ACN e hidróxido de amonio a una

Objetivo 5

concentración de 10 mM. A continuación, se comenzó el programa de cromatografía donde se inyectó la muestra en un sistema HP 1200 (Agilent Technologies). La separación se realizó mediante una columna *Zorbax extended C18, 100 x 22,1 mm id, 3,5 μ m, 300 Å* (Agilent Technologies) a un flujo de 0,2 ml/min. Durante el proceso, la separación de la muestra se consiguió a través del aumento continuado de la concentración de ACN en la fase móvil favoreciendo la elución de diferentes fracciones de la misma (fase móvil A: 95% H₂O y 5% ACN; fase móvil B: 10% H₂O y 90% ACN). Se recogieron aproximadamente 40 tubos en un colector de fracciones *Gilson FC203B* (Gilson) durante un periodo de tiempo de entre 10-70 min. Finalmente, basándose en la intensidad de los picos del cromatograma ($\lambda=214\text{nm}$), algunas de las fracciones se mezclaron para reducir el número de muestras totales.

Con el objetivo de aumentar el número de proteínas identificadas por MS, se realizó una segunda separación a pH ácido en un nano-HPLC (Eksigenet) donde, las fracciones obtenidas anteriormente (a pH básico) se evaporaron y se reconstituyeron en un tampón formado por 2% de ACN y 0,1 % de TFA. De nuevo, tras inyectar 10 μ l de cada fracción en una columna *Intergrafit C18, Proteopep II, 75 μ m id, 10m2 cm, 5 μ m, 300 Å* (New objective), los péptidos eluyeron a una velocidad de 0,35 μ l/min durante 1 h donde, a lo largo del transcurso de la fase móvil, se incrementó de manera continuada la concentración de ACN (fase móvil A: 0,1% TFA y 2% ACN; fase móvil B: 0,1% TFA y 95% ACN). En este caso, las fracciones resultantes de la separación se mezclaron con la matriz compuesta por ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich) a una concentración de 3 mg/ml en 0,1% de TFA y 70% de ACN con 2 μ l de angiotensina como control interno y se recogieron a una velocidad de 1,2 μ l/min por un colector *Sun Collect MALDI Spotter/Micro Collector* (*SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH*) que pipetea una gota de cada fracción cada 15 seg en una placa MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*) 384 para análisis por MS.

Objetivo 5

5.- Identificación y cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas

La espectrometría de masas tipo *MALDI* es una técnica de análisis que se basa en la excitación de la muestra a través del empleo de un láser y una matriz (ácido α -hidroxicinámico). La incidencia del láser provoca el cambio de estado de los iones de una muestra, de sólido a gas, lo que permite diferenciar y detectar cada uno los iones que conforman cada analito en base a su relación m/z .

La adquisición de los datos se realizó con el paquete informático *4000 Series Explorer version 3.5.1* (ABSciex) mediante el empleo de un *4800 analyzer* equipado con un analizador de *time-of-flight (TOF)* (Sciex).

Una vez dispensadas las fracciones en la placa *MALDI*, se introdujo en el analizador y se obtuvo un espectro de masas de entre 800 y 4000 m/z a partir de 1500 disparos del láser en cada fracción a una intensidad de luz de 3800 kV. Tras adquirir el espectro de masas (*MS*), las masas se seleccionaron para la fragmentación de los péptidos (*MS/MS*), excluyendo los picos correspondientes a la tripsina o a otros componentes conocidos. En este caso, el láser incidió 1800 veces en cada fracción de muestra con una intensidad de 4700 kV.

6.- Análisis del proteoma

Los datos obtenidos mediante *MS* se analizaron y compararon utilizando el programa informático *ProteinPilot™ version 4.5* (ABSciex). Este programa presenta dos tipos de algoritmos que permiten, por un lado, identificar las proteínas presentes en la muestra determinando un porcentaje de confianza del 95% que refleja la probabilidad de obtener un falso positivo y, por el otro, permite una cuantificación relativa de las mismas, basada en la intensidad de cada uno de los picos que se detectan en el espectro de fragmentación de cada péptido en la región

Objetivo 5

de los tags (113-121) y expresada como ratio. Cada espectro obtenido se buscó y comparó con la información ofrecida por la base de datos Uniprot/Swissprot (UniProt 2015_05 versión que contiene 547.599 secuencias y 195.014.757 residuos, con la restricción taxonómica de *Homo sapiens*). Los parámetros de búsqueda en el *ProteinPilot* se configuraron como digestión con tripsina y cisteína modificada con metil-metanotiosulfato. Del mismo modo, se excluyeron todas aquellas proteínas que no se identificaron con al menos 2 péptidos con un nivel de confianza del 95%. Además, debido a la complejidad de las muestras, se utilizó el paquete informático *Proteomics System Performance Evaluation Pipeline* de manera independiente con el objetivo de reducir la tasa de falsos descubrimientos e identificaciones a un 1%. Finalmente, todos los datos se normalizaron y analizaron estadísticamente a partir del programa *ProteinPilot*.

Con el objetivo de estudiar en mayor profundidad el conjunto de proteínas identificadas, se llevó a cabo un análisis bioinformático basado en el empleo de herramientas citadas a continuación:

- *PANTHER* (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*- <http://www.pantherdb.org/about.jsp>)
- *GO* (*Gene Ontology*- <http://geneontology.org>)
- *STRING* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*- <http://string-db.org>)
- Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>)
- *Uniprot* (<https://www.uniprot.org>)
- *The human gene database GeneCards*® (<https://www.genecards.org>)

6.1 Análisis de la expresión diferencial de las proteínas de cíbridos transmitocondriales

Una vez obtenida la lista de proteínas encontradas en los cíbridos transmitocondriales, se realizó un análisis comparativo entre la abundancia

Objetivo 5

relativa de cada proteína basándose en la técnica de marcaje con *iTRAQ* con el *ProteinPilot*. Para ello, los datos se normalizaron en base a los controles (denominador), asumiendo que las muestras están combinadas en un ratio 1:1. Para ello, se realizaron 4 análisis donde lo que se modificó fue el denominador de la normalización. Así, un primer análisis se realizó teniendo en cuenta los cíbridos N portadores del haplogrupo de ADNmt H, es decir, se normalizaron los cíbridos N-J (116-119 *iTRAQ*) frente a los N-H (115-118 *iTRAQ*). Una vez obtenidos los valores de los ratios (116-119/115 o 116-119/118) y su *p-valor*, se seleccionaron aquellas proteínas que estuvieran moduladas de manera significativa en al menos 3 de los 4 valores. A partir de ahí, se estudió qué proteínas de las seleccionadas se encontraban reguladas de manera positiva (incrementadas) o negativa (disminuidas) estableciendo un punto de corte estándar de 1,5 (mayor de 1,5 significó incrementadas y menor de 0,66, disminuidas) y cuál de estas presentaba alguna relación con la función mitocondrial.

Siguiendo esta metodología se llevaron a cabo los otros 3 análisis donde se enfrentaron los valores obtenidos por los cíbridos OA-J con los obtenidos por los cíbridos OA-H (117-121/113 y 117-121/114), lo que permitió estudiar el efecto del haplogrupo en la modulación proteica, y finalmente, el análisis entre cíbridos N-H y OA-H o N-J y OA-J (Ratio 113-114/115 y 113-114/118) (Ratio 117-121/116 y 117-121/119).

6.2 Análisis del proteoma mitocondrial de cíbridos transmitocondriales

Con el objetivo de estudiar aquellas proteínas que parecen jugar un papel importante en la función mitocondrial de los cíbridos, se comparó la lista de proteínas totales obtenidas con la base de datos de *Human.MitoCarta 2.0* (262, 263). Esta base de datos incluye la información detallada de la localización y distribución de 1158 genes humanos a lo largo de 14 tejidos del cuerpo humano que codifican proteínas que se encuentran principalmente asociadas a la

Objetivo 5

mitocondria, lo que permitió identificar el total de proteínas asociadas a la función mitocondrial presentes en nuestra muestra.

Posteriormente, se estudió qué proteínas de las expresadas diferencialmente en el apartado anterior se correspondían con proteínas asociadas a la mitocondria con el objetivo de evaluar la función proteica mitocondrial entre los diferentes grupos de híbridos a estudio.

Objetivo 5

1.- Identificación de proteínas intracelulares y asociadas a la función mitocondrial

La identificación del proteoma de los cíbridos transmitocondriales originados a partir de donantes normales o artrósicos se realizó mediante la técnica de marcaje *iTRAQ*. Para ello, el extracto proteico de cada muestra se digirió con tripsina y los péptidos resultantes se marcaron con 8 marcadores *iTRAQ* diferentes. Una vez las muestras se etiquetaron, se mezclaron y la muestra resultante se separó mediante cromatografía líquida de fase reversa; las proteínas se identificaron y cuantificaron de manera relativa mediante espectrometría de masa en tándem (*MS/MS*) (Figura 73).

El análisis proteómico basado en el marcaje *iTRAQ* permitió identificar un total de 1023 proteínas de las cuales, 601 fueron identificadas con al menos 2 péptidos con un porcentaje de confianza del 95% (Anexo II- Tabla 1).

Con el objetivo de estudiar la función y localización de las 601 proteínas identificadas, se realizó un análisis de *GO* mediante la herramienta informática *PANTHER*. Este tipo de análisis permite conocer la función molecular, el papel que juega dentro de diferentes procesos biológicos y la localización en la célula de las proteínas de una manera visual a través del empleo de diagramas de sectores.

El resultado del análisis de la función molecular de las 601 proteínas identificadas con al menos 2 péptidos reveló que el 47,7% son proteínas de unión a diferentes sustratos (cromatina, ARNr, carbohidratos, ...), alrededor del 30,4% presentan actividad catalítica y el 10,9% tienen un papel estructural (Figura 74 a).

Objetivo 5

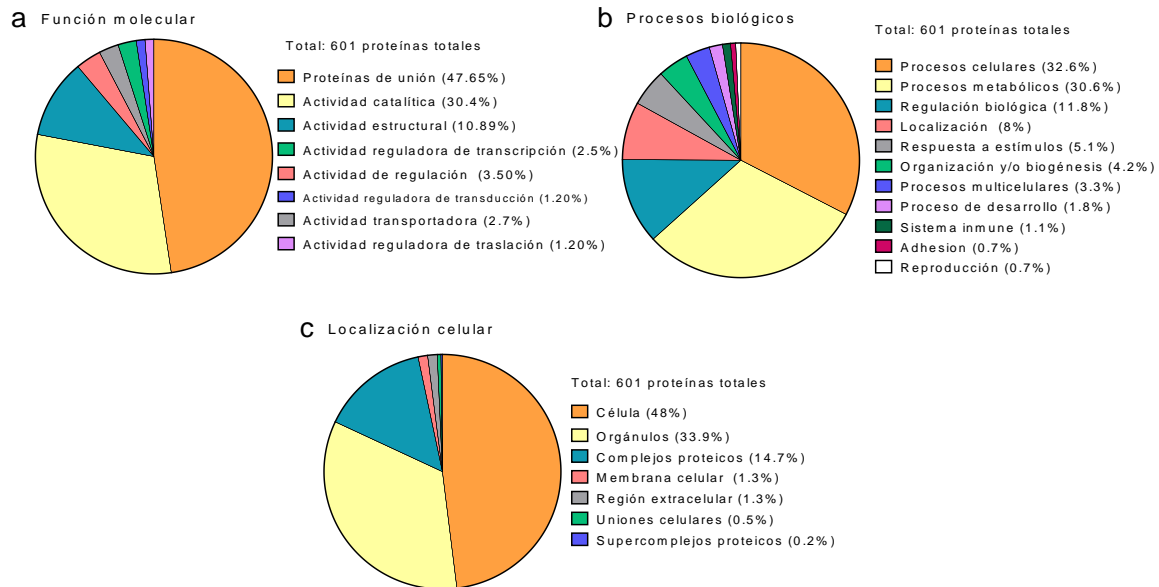


Figura 74 Análisis por GO de las 601 proteínas identificadas. Se muestra el porcentaje de proteínas en cada una de las categorías de la función molecular (a), procesos biológicos (b) y localización celular (c).

El análisis de los procesos biológicos mostró que el 32,6% de las 601 proteínas se encuentran involucradas en procesos celulares (ciclo celular, muerte, organización y homeostasis, secreción, transducción de señales, etc.). Un 30,6% juega un papel relevante en procesos metabólicos, un 11,8% en la regulación biológica de la célula y un 8% de las proteínas totales actúan en sistemas de localización celular. El porcentaje restante de las proteínas ($\leq 5\%$) se ven implicadas en respuesta a estímulos, procesos de organización, biogénesis o desarrollo y reproducción (Figura 74 b).

Dentro del análisis de la localización celular de las proteínas identificadas, la mayor parte se encuentran formando parte de la célula (48%), un tercio (33,9%) se asocian a orgánulos celulares y un 14,7% tiende a formar complejos proteicos. Solamente un 1,3% se localiza tanto en la membrana celular como en regiones extracelulares (Figura 74 c).

Una vez identificadas estas 601 proteínas, el paso siguiente consistió en conocer cuáles de ellas eran proteínas asociadas a la mitocondria. Para ello, se realizó un

Objetivo 5

análisis comparativo entre las 601 proteínas obtenidas y las 1158 que conforman la base de datos *Human.MitoCarta 2.0* mediante la herramienta informática Venny 2.1. El análisis reveló que, únicamente 78 de las 601 proteínas identificadas en el primer análisis, presentan una función relacionada con la mitocondria (Figura 75 a). Las 78 proteínas con relación mitocondrial identificadas se recogen en la Anexo II- Tabla 2.

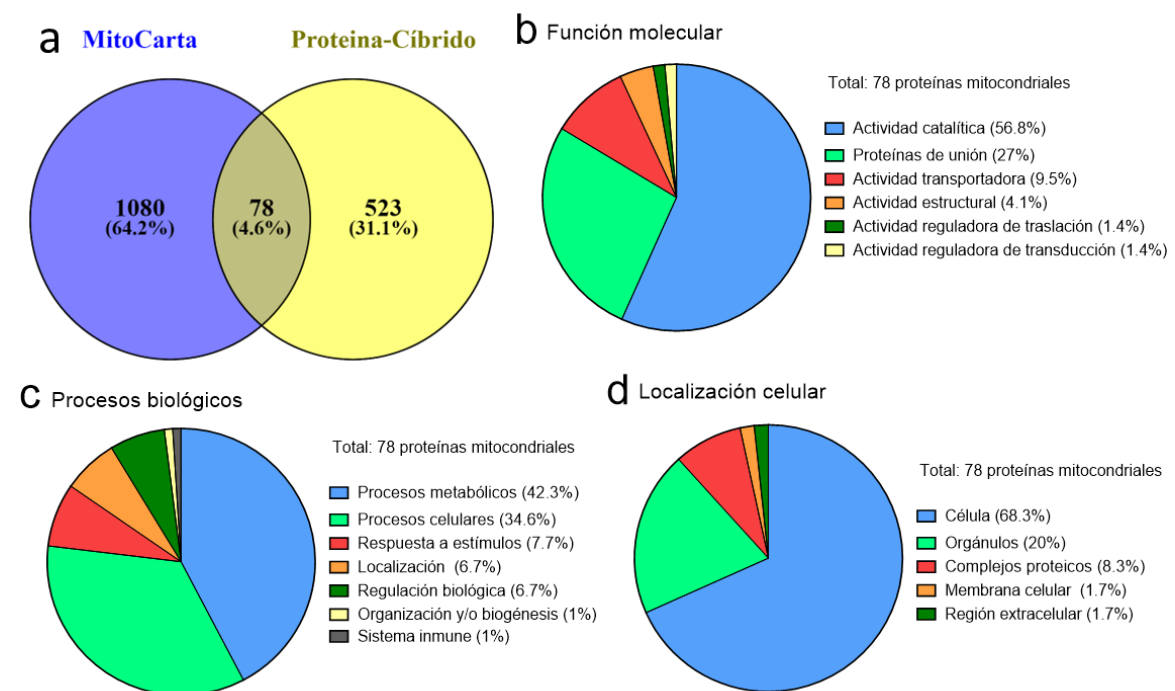


Figura 75 Determinación de las proteínas asociadas a la función mitocondrial. **(a)** Análisis Venny del conjunto de proteínas que se asocian a la mitocondria del total de 601 proteínas identificadas. **(b-d)** Análisis por GO de las 78 proteínas identificadas con función relacionada a la mitocondria donde se muestra el porcentaje de proteínas en cada categoría de la función molecular **(b)**, procesos biológicos **(c)** y localización celular **(d)**.

Al igual que en el caso anterior se realizó un análisis GO utilizando la misma herramienta informática. El resultado del análisis de la función molecular reveló que, dentro de las 78 proteínas asociadas a la mitocondria, el 56,8% presenta actividad catalítica, el 27% son clasificadas como proteínas de unión, un 9,5% presentan actividad transportadora y el 4,1% actividad estructural (Figura 75 b).

Objetivo 5

El análisis de los procesos biológicos mostró que al menos un 42,3% parecen estar implicados en procesos metabólicos, un 34% se encuentran involucradas en diversos procesos celulares, un 7,8% se relaciona con respuesta a estímulos y un 6,7% parecen estar implicadas en localización y en regulación biológica. El porcentaje restante (1%) se engloban en procesos de organización, biogénesis y sistema inmune (Figura 75 c).

Dentro de la localización celular de las 78 proteínas identificadas, más de la mitad (68,3%) presentan una localización celular y un 20% se hallan asociadas a orgánulos. El 8,3% tiende a formar complejos proteicos y un 1,7% se localiza tanto en la membrana celular como en regiones extracelulares (Figura 75 d).

2.- Cuantificación relativa y caracterización funcional de proteínas totales

El programa informático *ProteinPilot* permite realizar la cuantificación relativa de las proteínas identificadas logrando diferenciar entre ellas por su expresión. Así, finalmente obtuvimos 4 listas de proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos de híbridos N-H, N-J, OA-H y OA-J. A la hora de analizar la función molecular que estas proteínas presentan en la célula se utilizaron las herramientas informáticas *UniProt* y *STRING* para establecer la relación entre las proteínas identificadas y conocer el papel que juegan en la función celular.

Para poner de relevancia el papel del haplogrupo H o J en los híbridos, se realizaron dos subanálisis teniendo como referencia el haplogrupo de ADNmt H puesto que es el mayoritario en la población europea. El primer de los subanálisis realizado entre los híbridos N portadores de ambos haplogrupos reveló un total de 20 proteínas reguladas (Anexo II- Tabla 3). 2 de ellas se encuentran disminuidas y 18 incrementadas tras el análisis comparativo entre N-J y N-H. Así, los híbridos N-J presentan una menor expresión de las proteínas Anexina 2 (ANXA2) y Vimentina

Objetivo 5

(VIM), cuya función reside en la unión y regulación del calcio celular y de la forma, organización e integridad del citoesqueleto, respectivamente (Figura 76 a). Por otro lado, los cíbridos N-J expresan en mayor medida en comparación con los N-H, un conjunto de proteínas localizadas mayormente en el núcleo e implicadas en la unión a proteínas o a compuestos orgánicos (rojo), así como un grupo de ellas dedicadas exclusivamente al metabolismo del ARN mediante la unión ácidos nucleicos, ensamblaje de la cromatina, etc. (azul) (Figura 76 b).

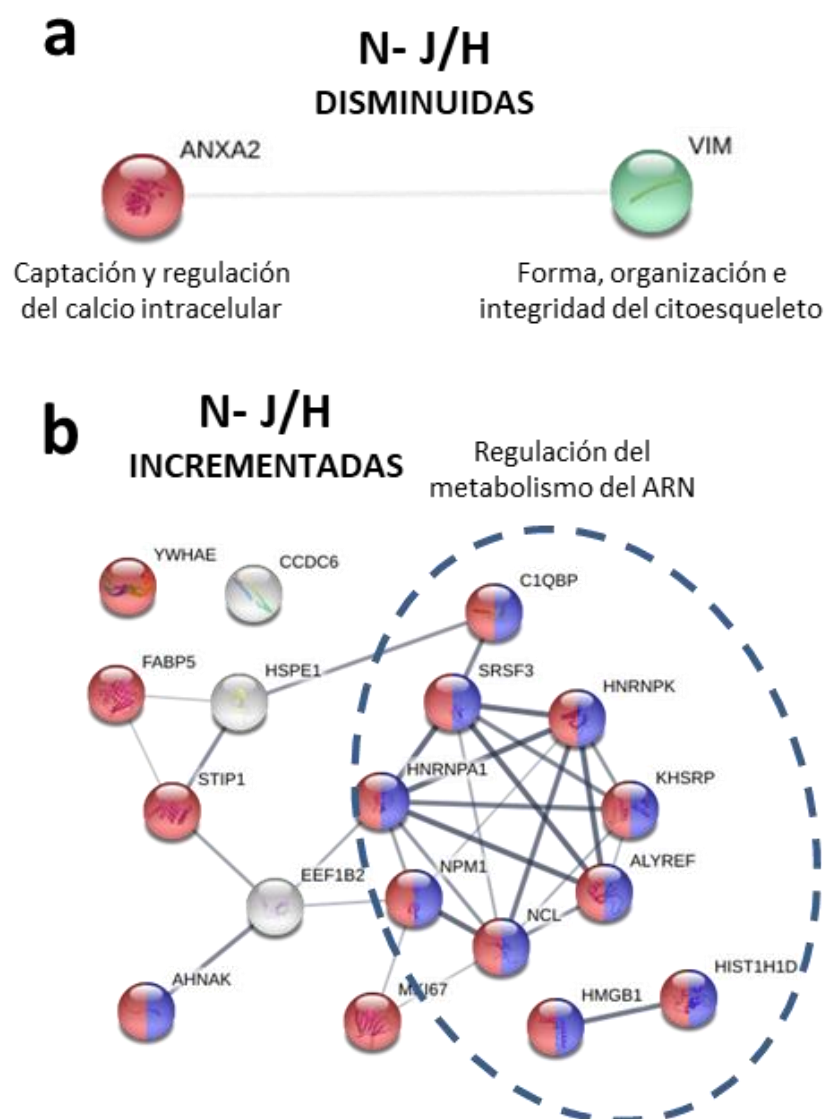


Figura 76 Perfil funcional de las proteínas diferencialmente expresadas por los cíbridos N. Análisis de las vías de señalización y función mediante *STRING* en las proteínas disminuidas (a) e incrementadas (b).

Objetivo 5

El segundo subanálisis se realizó entre los cíbridos OA portadores de ambos haplogrupos de ADNmt y reveló un total de 75 proteínas expresadas diferencialmente, de las cuales 53 están disminuidas y 22 incrementadas en los cíbrido OA-J frente a los OA-H (Anexo II- Tabla 4).

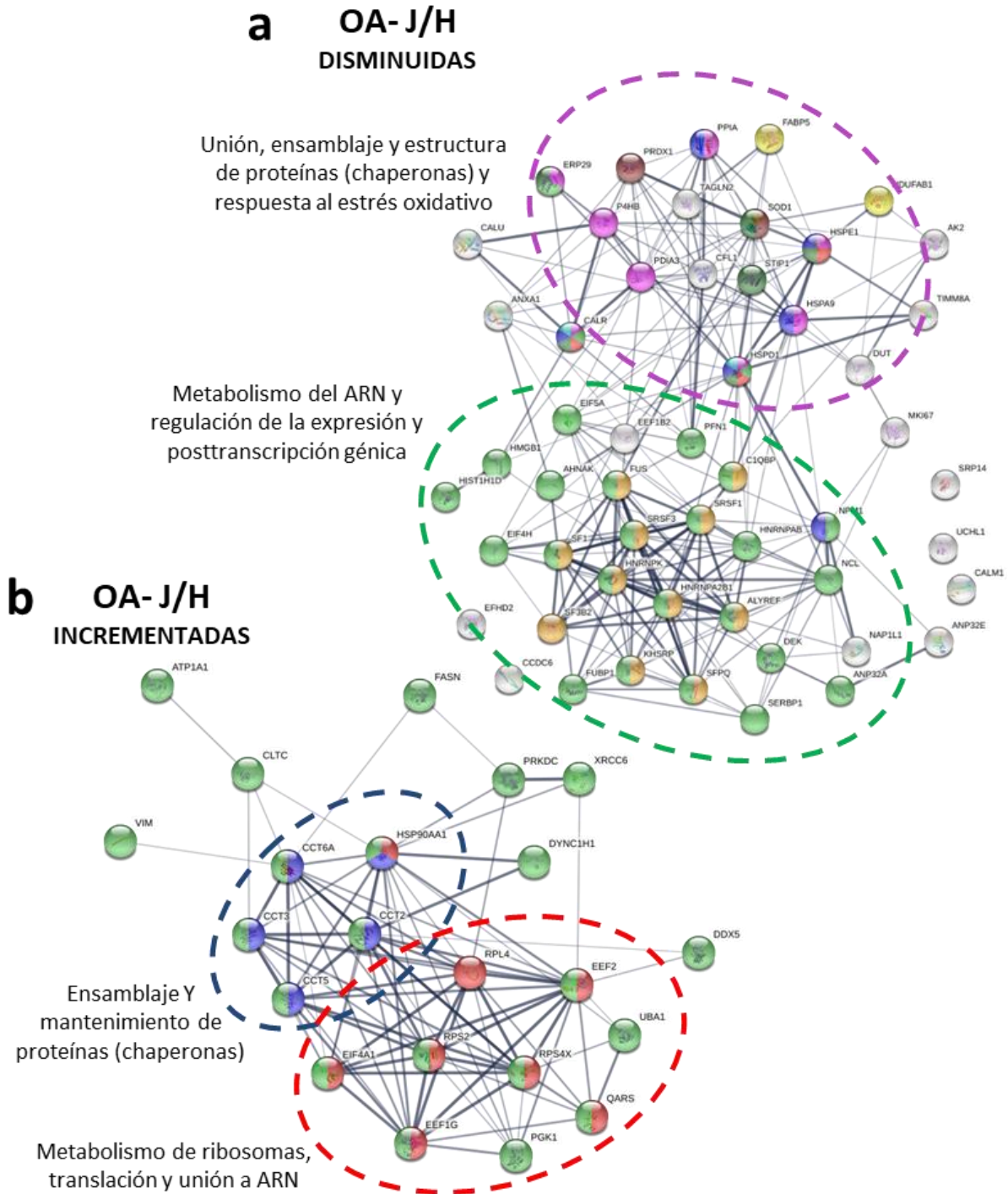


Figura 77 Perfil funcional de las proteínas diferencialmente expresadas por los cíbridos OA. Análisis de las vías de señalización y función mediante *STRING* en las proteínas disminuidas (a) e incrementadas (b).

Objetivo 5

El análisis de la función en las proteínas disminuidas reflejó grupos claramente diferentes. Un grupo formado principalmente por proteínas implicadas en el metabolismo del ARN y de la expresión génica, y un segundo grupo más heterogéneo constituido por proteínas de unión a otras moléculas celulares centrado en la función chaperona, así como en la respuesta al estrés oxidativo (Figura 77 a). Los cíbridos OA-J presentaron una mayor expresión de proteínas que se encuentran mayormente en el citoplasma y están implicadas en la regulación de procesos metabólicos (unión al ATP, nucleótidos, compuestos orgánicos o drogas), nuevamente dividido en dos grupos cuyas funciones principales son el ensamblaje de proteínas y el metabolismo de los ribosomas y del ARN (Figura 77 b).

Para poner de relevancia el papel de la patología, se realizaron otros dos subanálisis teniendo como referencia los cíbridos N. El primer subanálisis se llevó a cabo entre los cíbridos OA-H y N-H desenmascarando la modulación de 70 proteínas. Del total de las 70 proteínas, se observaron un conjunto de 16 proteínas disminuidas y 53 incrementadas (Anexo II- Tabla 5). Así, cíbridos OA-H presentaron una modulación negativa de proteínas que se localizan mayormente en el citoplasma y están implicadas principalmente en el transporte de moléculas celulares, observándose dos subgrupos cuya función reside en unión, formación y ensamblaje de proteínas y regulación de procesos catabólicos y de transporte de vesículas (Figura 78 a). Por su parte, este grupo de cíbridos (OA-H) expresaron de manera incrementada frente a los N-H proteínas características de la función nuclear englobando 2 grupos: un grupo constituido por proteínas implicadas en el metabolismo del ARN y regulación de la expresión génica y otro que engloba proteínas que se encargan de la regulación de la respuesta frente a diferentes estímulos (Figura 78 b).

Objetivo 5

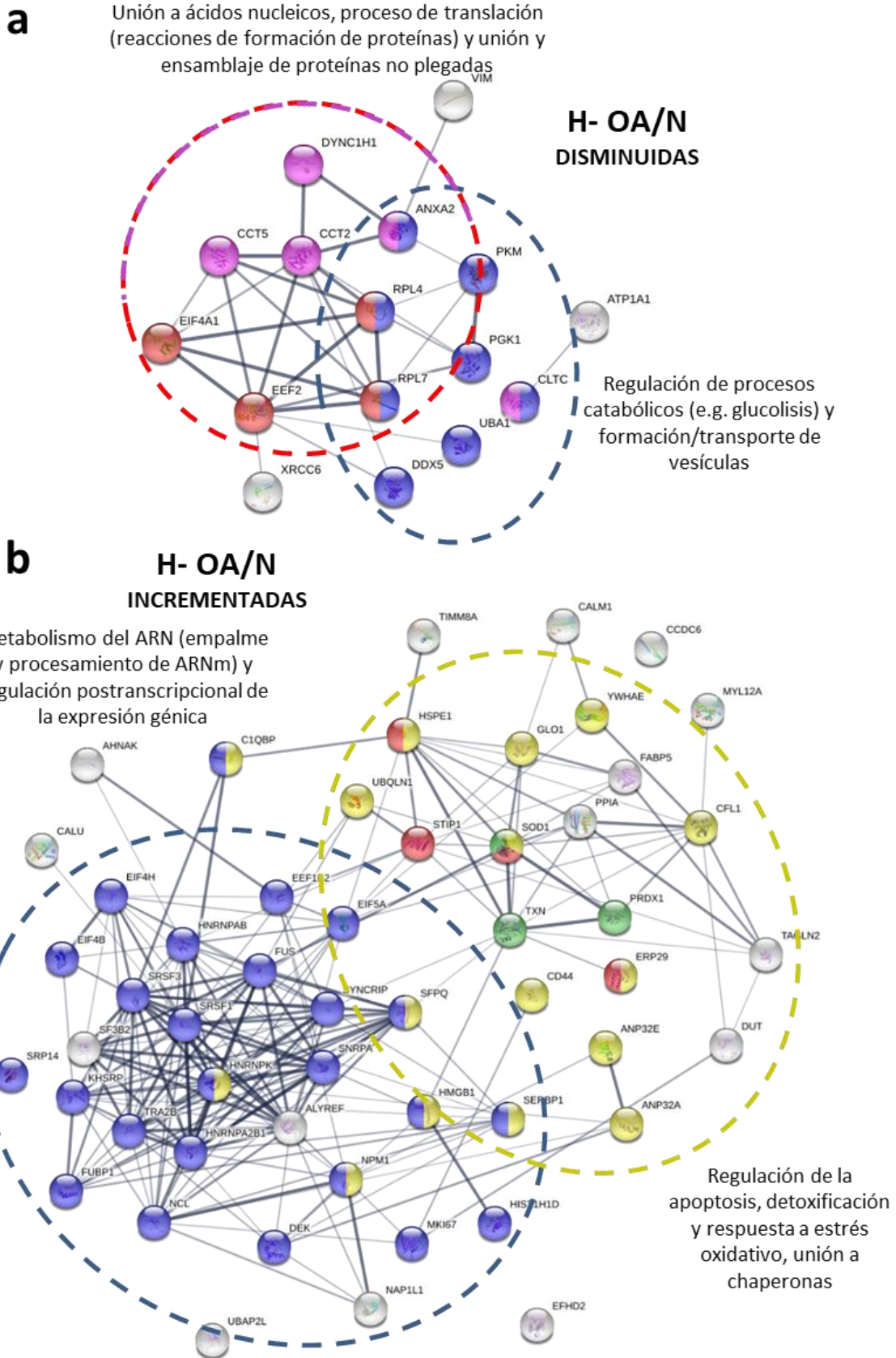


Figura 78 Perfil funcional de las proteínas diferencialmente expresadas por los híbridos portadores del haplogrupo de ADNmt H. Análisis de las vías de señalización y función mediante *STRING* en las proteínas disminuidas (a) e incrementadas (b).

Objetivo 5

El segundo subanálisis se realizó entre los cíbridos OA-J y N-J reflejando un total de 20 proteínas expresadas diferencialmente, de las cuales 16 están disminuidas y 4 incrementadas (Anexo II- Tabla 6). La caracterización funcional de las proteínas moduladas negativamente reflejó que los OA-J presentan proteínas con una expresión disminuida localizadas en el núcleo e implicadas en el metabolismo del ADN y ARN, así como la función chaperona implicada en ambos metabolismos (Figura 79 a). Por otro lado, estas mismas células presentaron una expresión incrementada de proteínas con actividad ATP asa y función chaperona que actúan en respuesta a citoquinas y frente al estrés celular (Figura 79 b).

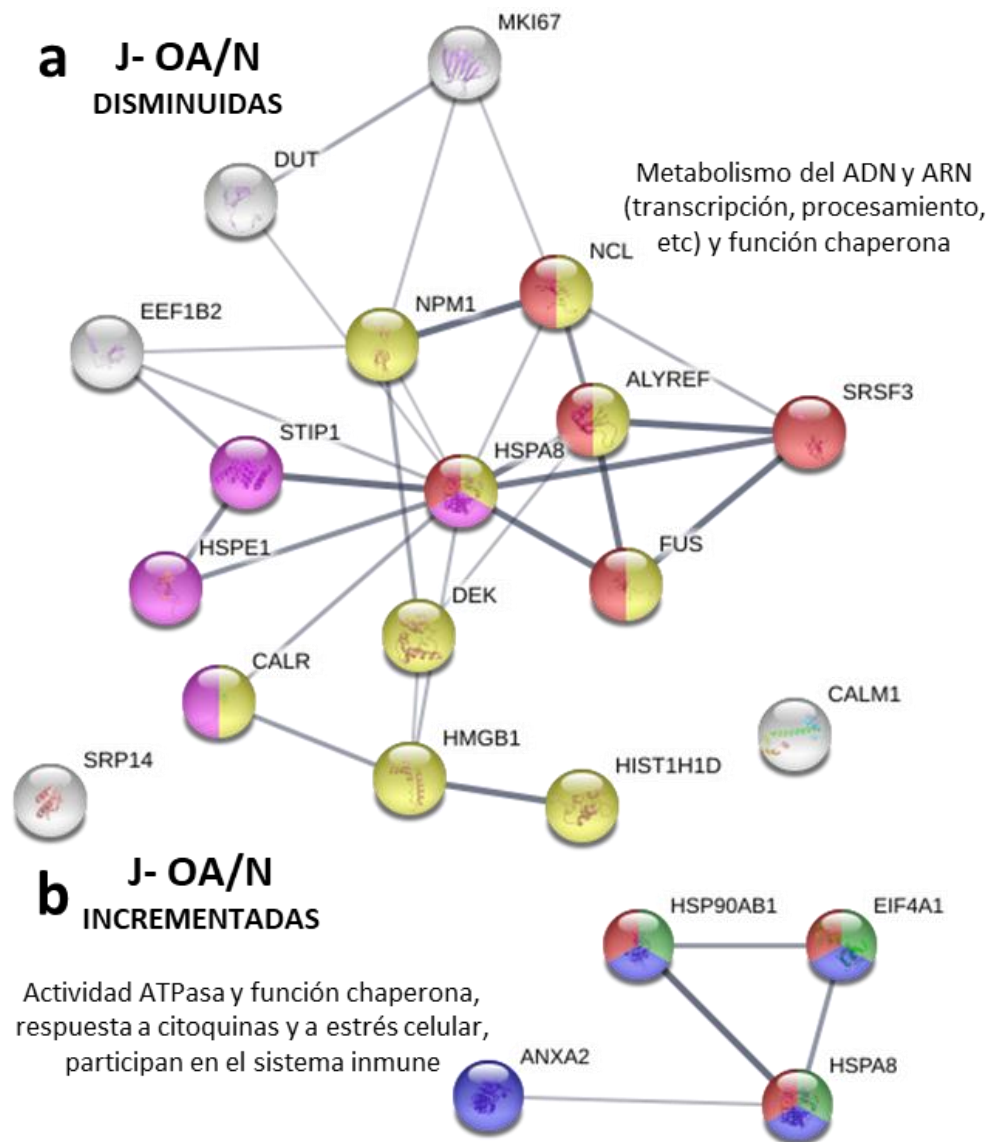


Figura 79 Perfil funcional de las proteínas diferencialmente expresadas por los cíbridos portadores del haplogrupo de ADNmt J. Análisis de las vías de señalización y función mediante *STRING* en las proteínas disminuidas (a) e incrementadas (b).

Objetivo 5

3.- Análisis de la expresión relativa y función de proteínas asociadas a la mitocondria

Una vez seleccionadas las proteínas que se expresan diferencialmente, se enfrentaron a las 78 proteínas asociadas a la mitocondria mediante el empleo de la herramienta informática Venny 2.0. Este análisis reveló un total de 11 proteínas que están moduladas y asociadas a la función mitocondrial (Figura 80) (Tabla 21). Así, se observó que los procesos metabólicos afectados a nivel mitocondrial se dividieron en dos grupos bien diferenciados. Un grupo comprende proteínas cuya función principal es chaperona (estructura y plegamiento) y transporte de proteínas en el interior del orgánulo y otro grupo que se constituye de proteínas implicadas en la biosíntesis de carbohidratos y ácidos grasos, respuesta al estrés y detoxificación de ROS, etc. (Figura 81).

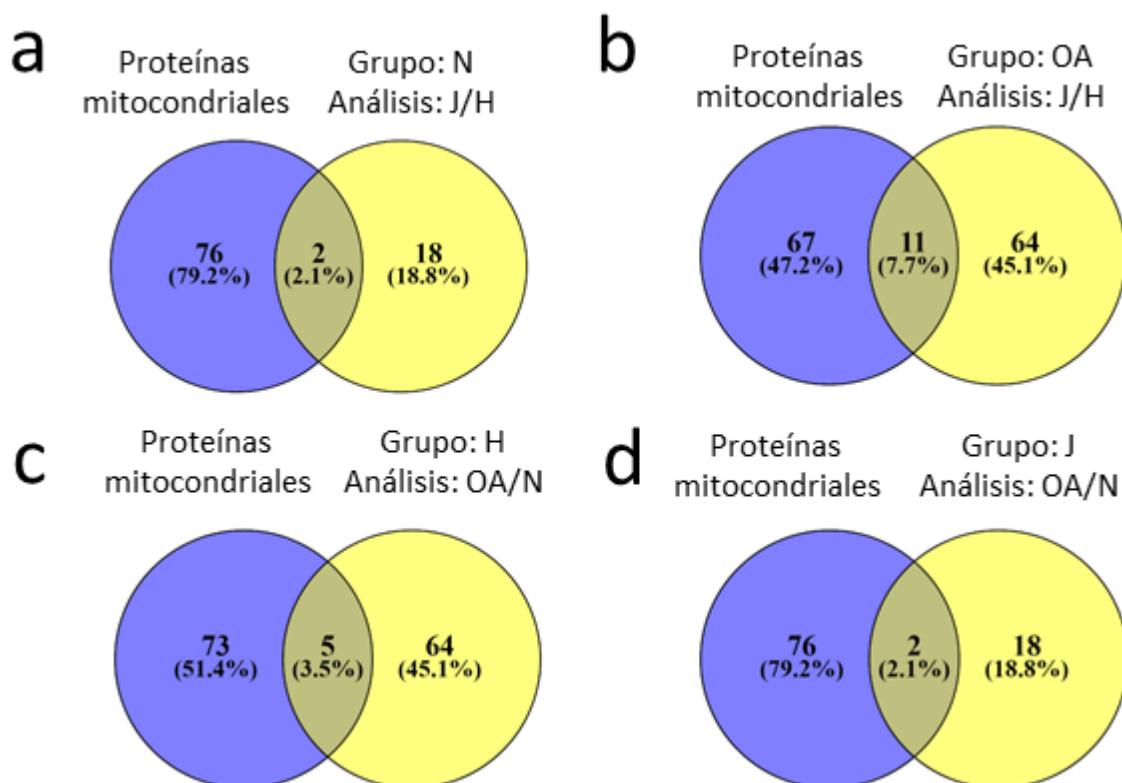


Figura 80 Análisis por VENNY del conjunto de proteínas expresadas diferencialmente en los híbridos N (a), OA (b), H (c) o J (d) realizados frente a las 78 proteínas identificadas con función asociada a la mitocondria.

Objetivo 5

Tabla 21 Total de proteínas expresadas diferencialmente y relacionadas con la función mitocondrial.

ACC. N ^o	SÍMBOLO GEN	ANÁLISIS			
		N J/H	OA J/H	H OA/N	J OA/N
P61604	HSPE1	↑	↓	↑	↓
Q07021	C1QBP	↑	↓	↑	-
P33316	DUT	-	↓	↑	↓
P00441	SOD1	-	↓	↑	-
O60220	TIMM8A	-	↓	↑	-
P10809	HSPD1	-	↓	-	-
P38646	HSPA9	-	↓	-	-
P07237	P4HB	-	↓	-	-
P54819	AK2	-	↓	-	-
O14561	NDUFAB1	-	↓	-	-
P49327	FASN	-	↑	-	-

ACC N^o: Accesion Number de las proteínas. Rojo: incrementadas. Verde: disminuidas.

Procesos metabólicos: biosíntesis de carbohidratos y ácidos grasos, respuesta a estrés celular, detoxificación de ROS, importe de proteínas, señalización, etc.

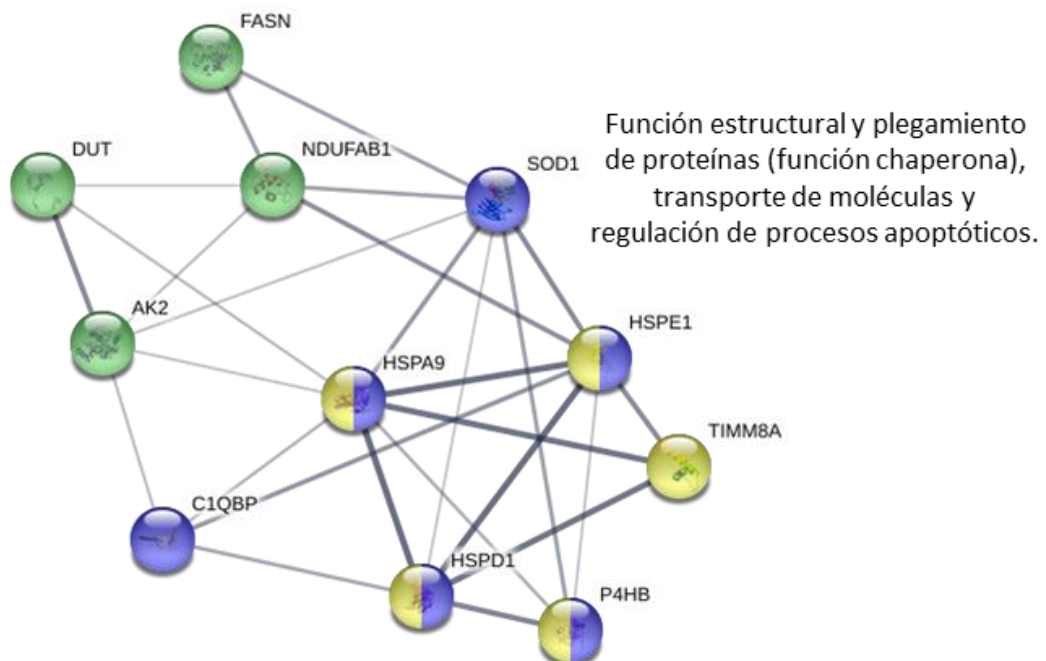


Figura 81 Análisis por *STRING* de las 11 proteínas expresadas diferencialmente identificadas y relacionadas con la función mitocondrial.

Objetivo 5

A continuación, siguiendo la misma línea que en el análisis de las proteínas totales, en primer lugar, se realizaron dos subanálisis con el objetivo de observar la influencia del haplogrupo de ADNmt teniendo como referencia los cíbridos H. Al realizar el primer subanálisis, entre los grupos N-J/N-H se observó que los cíbridos N-J presentan las proteínas *HSPE1* y *C1QBP* incrementadas en comparación con los N-H. *HSPE1* es una chaperona cuya principal función es la importación y el ensamblaje de macromoléculas en el interior de la mitocondria. Por su parte, *C1QBP* es una proteína multifuncional que parece jugar un papel importante en diferentes mecanismos celulares como la respuesta a inflamación y a procesos infecciosos, biogénesis de ribosomas, síntesis de proteínas mitocondriales, regulación de la apoptosis, etc.

El segundo subanálisis entre los grupos de cíbridos OA-J/OA-H mostró que, en relación a los OA-H, los cíbridos OA-J solamente presentaron aumentada la proteína FASN, que es una proteína que forma parte del metabolismo de ácidos grasos, ya que cataliza la formación de ácidos grasos de cadena larga a partir de Acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH. Sin embargo, los cíbridos portadores de este haplogrupos de ADNmt mostraron una expresión disminuida de las siguientes proteínas: *HSPE1*, *C1QBP*, *HSPD1*, *HSPA*, *TIMM8A*, *P4HB*, *DUT*, *AK2*, *SOD1* y *NDUFAB1*.

En el caso de *HSPE1*, *HSPD1*, *HSPA* y *P4HB* se trata de chaperonas cuya función, como se describió anteriormente, se centra principalmente en transporte, plegamiento y ensamblaje de las proteínas tras ser importadas en la mitocondria. En concreto *HSPA* parece jugar un papel importante en la biogénesis del *clúster* de hierro-sulfuro, estructura que se encuentra en proteínas implicadas en el transporte de electrones, y *P4HB* cataliza la formación, rotura y reordenamiento de los enlaces disulfuro uniendo diferentes partes de una proteína lo que le confiere un plegamiento concreto, por lo que, en parte, esta proteína presenta actividad

Objetivo 5

chaperona. También, *HSPD1* junto con *HSPE1*, forman parte de la reparación y reestructuración de aquellas proteínas situadas en la matriz mitocondrial y que se han visto afectadas por condiciones de estrés.

Por su parte, *TIMM8A* presenta una gran relevancia ya que es un transportador situado en la membrana interior de la mitocondria que participa en la importación e inserción de múltiples proteínas en la propia membrana o el interior mitocondrial. Además, una de las principales características de esta proteína es que presenta actividad chaperona, puesto que protege los precursores hidrofóbicos de la agregación y mal ensamblaje durante su translocación al interior mitocondrial.

DUT y *AK2* son enzimas implicadas en el metabolismo de los nucleótidos. *DUT* presenta un papel citoprotector, ya que regula la incorporación del uracilo al ADN mediante la producción del precursor inmediato de la timina, lo que disminuye la acumulación de dUTP, cuyo incremento produce la fragmentación del genoma. Por su parte, *AK2* regula la composición de los nucleótidos de adenina, ya que transfiere grupos fosfato entre este tipo de nucleótido jugando un papel importante en el balance energético (ATP-AMP) y en la apoptosis. Además, se encuentra principalmente en el espacio intermembrana de la mitocondria y parece estar implicada en la apoptosis.

Finalmente, *SOD1* es una proteína encargada de convertir los radicales libres de oxígeno en peróxido de hidrógeno, es decir, detoxificar ROS y *NDUFAB1* es una subunidad proteica del complejo I (NADH oxidorreductasa), también conocida como *acyl-carrier protein (ACP)*, que está implicada en el transporte de electrones y síntesis de ATP, participando en la generación de calor mediante el desacoplamiento de proteínas.

Objetivo 5

En segundo lugar, con el objetivo de poner de relevancia el papel de la patología, se realizaron otros dos subanálisis teniendo como referencia los cíbridos N. Así, el primer subanálisis entre los cíbridos OA-H/N-H reflejó que, durante el desarrollo de la patología artrósica, la expresión proteica de proteínas como *HSPE1*, *DUT*, *C1QBP*, *SOD1* y *TIMM8A* se vio incrementada en los cíbridos OA-H frente a los N-H. *DUT* es una proteína cuya principal función reside en el metabolismo de los nucleótidos.

A la hora de llevar a cabo el segundo subanálisis entre los cíbridos OA-J/N-J, se observó que los cíbridos OA presentan disminuidas las proteínas *HSPE1* y *DUT*, por lo que la función de plegamiento de otras proteínas en el interior mitocondrial o el mecanismo citoprotector en el metabolismo de los nucleótidos podría verse afectado con el desarrollo de la OA en estos cíbridos.

Objetivo 5

El proteoma celular es una de las partes más importantes de una célula ya que constituye la última línea de acción en la generación de una respuesta celular adecuada y adaptada al entorno fisiológico de la propia célula (255). Por ello, el empleo de técnicas proteómicas, y en concreto la proteómica comparativa a nivel mitocondrial en cíbridos, se considera una herramienta útil a la hora de analizar modificaciones en el proteoma mitocondrial que posiblemente son capaces de inducir perturbaciones metabólicas a nivel celular (254).

Los resultados obtenidos en este objetivo de tesis mostraron un total de 601 proteínas identificadas y expresadas diferencialmente entre los 4 grupos a estudio (N, OA, H y J). Tras un análisis comparativo entre ellos, se observó que estas proteínas están mayormente implicadas en el metabolismo de los nucleótidos, ADN y ARN y en la función chaperona, cuya principal función es el correcto plegamiento, ensamblaje, mantenimiento y transporte de otras moléculas.

Hoy en día se ha descrito que la mitocondria juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis proteica a nivel celular, por lo que presenta su propia maquinaria de control (264). Teniendo en cuenta que las muestras analizadas provienen de diferentes cíbridos donde el único componente celular que difiere entre ellos es el ADNmt, se analizaron aquellas proteínas expresadas diferencialmente y relacionadas con la función mitocondrial. Para ello a partir de la fracción proteica obtenida del total celular, gracias al empleo de la base de datos MitoCarta, se consiguió identificar y estudiar solamente las proteínas mitocondriales expresadas diferencialmente a nivel celular y aquellas que presentan asociación con la función mitocondrial. Con todo ello, cabe destacar que una de las limitaciones que presenta este estudio es que el análisis del proteoma mitocondrial se llevó a cabo a partir de muestras celulares.

Objetivo 5

Por ello, sería interesante corroborar los resultados obtenidos en este objetivo con el análisis del proteoma mitocondrial, obtenido únicamente a partir de la fracción mitocondrial, siguiendo la metodología que se describe en la literatura (253).

Así, los 4 análisis llevados a cabo entre los grupos de estudio revelaron 78 proteínas relacionadas con la función mitocondrial, de las cuales 11 estaban expresadas diferencialmente.

En primer lugar, al estudiar los cíbridos N en función de los haplogrupos de ADNmt teniendo como referencia el haplogrupo de ADNmt H, se observó que los cíbridos N-J presentan las proteínas *HSPE1* y *C1QBP* aumentadas. Sin embargo, a la hora de estudiar los cíbridos OA, se vio que los cíbridos OA-J presentan estas dos proteínas disminuidas, lo que podría reflejar la influencia de los haplogrupos de ADNmt en el comportamiento diferencial de los cíbridos N y OA, quizás mostrando alguna relación con el desarrollo de la enfermedad. Ambas proteínas (*HSPE1* y *C1QBP*) se encuentran involucradas principalmente en procesos de estructuración, plegamiento y eliminación de otras moléculas y en el balance energético, jugando también un papel importante en la regulación positiva de la apoptosis (265-268).

Este análisis revela que los cíbridos OA-J presentan una menor expresión de ambas proteínas, lo que podría relacionarse con una disminución de la apoptosis. Sin embargo, a la hora de analizar más pormenorizadamente el proceso de muerte celular programada en este mismo modelo celular (objetivo 3, Anexo II), no se observaron apenas diferencias entre los OA-H y OA-J. No obstante, diversos autores utilizando cíbridos describieron una menor expresión de genes relacionados con la apoptosis en comparación con aquellos portadores del haplogrupo de ADNmt H (101, 269). Un estudio reciente basado en un análisis epigenético entre muestras obtenidas de pacientes portadores de ambos haplogrupos de ADNmt (H y J), observaron que el proceso apoptótico se

Objetivo 5

encontraba reprimido en las muestras portadoras del haplogrupo de ADNmt J (270). Estos resultados proporcionan, al menos en parte, una posible explicación funcional entre la asociación del haplogrupo de ADNmt J con una menor tasa de progresión de la enfermedad, ya que pese al ser mitocondrias de pacientes OA, el ser portador del haplogrupo de ADNmt J parece conferir protección durante el proceso artrósico (99, 122).

El subanálisis realizado en los híbridos OA, teniendo como referencia el haplogrupo de ADNmt H, reflejó un número mayor de proteínas expresadas diferencialmente. Sin embargo, solo una proteína reflejó su expresión incrementada en los híbridos OA-J frente a los OA-H, mientras que 10 se vieron disminuidas. La proteína incrementada fue *FASN* cuya función es generar ácidos grasos de cadena larga a partir de Acetil-CoA y otros compuestos (271), lo que podría indicar que estos híbridos presentan un mayor metabolismo de los ácidos grasos. Este dato concuerda con los descrito por Dalmao-Fernandez y colaboradores (Anexo III), así como con datos descritos en el objetivo 4 de esta tesis, donde se describe que los híbridos OA-J incorporan mayor cantidad de ácidos grasos complejos en forma de TAG y forman mayor cantidad de gotas lipídicas.

Entre las 10 proteínas disminuidas en los híbridos OA-J frente a los OA-H, se encuentra *NDUFAB1* (*acyl-carrier protein- ACP*), que participa en la elongación de ácidos grasos ya que es un transportador de aciles, así como un integrante del complejo I de la CTE sin función catalítica que parece tener un papel en el acoplamiento de la CTE y, por tanto, de la fosforilación oxidativa, jugando un papel en el balance energético (272). Se ha propuesto que en un estado de baja producción de Acetil-CoA, las células disminuyen la expresión de *ACP* y el ensamblaje de la CTE, lo que provoca una disminución de la capacidad oxidativa y favorece la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, y viceversa. Por lo que, esta proteína podría actuar como sensor de los niveles de Acetil-CoA y regular en

Objetivo 5

este sentido la capacidad respiratoria en función de los nutrientes o del estatus celular (272).

Por lo que los resultados obtenidos, apuntan que los híbridos OA-J parecen regular su metabolismo glucolítico y lipídico de una manera coordinada y diferente a los H. Esto les confiere posiblemente un sistema de protección más eficaz, manteniendo un metabolismo mayormente glucolítico, quizás gracias a la inhibición del acoplamiento y ensamblaje de la CTE y favoreciendo la biosíntesis y el almacenamiento de ácidos grasos en forma de gotas lipídicas mediante la regulación de los niveles de expresión de *ACP* y *FASN*.

Una gran parte de las proteínas disminuidas en los híbridos OA-J presentaron función chaperona o transportadora (*HSPD1*, *HSPA*, *TIMM8A* o incluso *P4HB*). De nuevo, este tipo de proteínas están implicadas en el correcto funcionamiento del transporte y translocación de otras moléculas (principalmente otras proteínas), lo que conlleva procesos de ensamblaje, plegamiento, agregación y mantenimiento, así como el control y la degradación de aquellas moléculas cuya estructura o función no es correcta (273). Al contrario de las proteínas que tienen una función específica a nivel del citosol, las proteínas generadas que posteriormente se trasladarán a la mitocondria deben enfrentarse al transporte y translocación a través del citosol y de membranas lipídicas, al cambio del pH en el interior de la matriz mitocondrial e incluso a diferencias en la temperatura entre los orgánulos y el resto de la célula. Por ello, todos estos procesos en los que están implicadas las chaperonas, deben coordinarse correctamente con el objetivo de mantener una buena comunicación mitocondria-núcleo que favorezca la homeostasis celular (264).

El hecho de que los híbridos OA-J presenten disminuidas este tipo de proteínas conlleva a pensar que las vías de comunicación entre la mitocondria y el núcleo son deficientes. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la influencia de los

Objetivo 5

haplogrupos de ADNmt en el intercambio de señales y regulación recíproca entre el núcleo y la mitocondria (270, 274). En un primer lugar cabe pensar que el proceso de hibridización haya podido influir en este resultado, sin embargo, en un estudio previo se describió que los híbridos generados a partir de diferentes ADNmt presentaban los mismos niveles de expresión de este tipo de proteínas que la línea parental y su correspondiente *Rho-0* en condición basal. En este caso, solamente los híbridos portadores del haplogrupo de ADNmt H mostraron un incremento en estas enzimas en relación a los J cuando se cultivaron las células en condiciones de estrés, como el aumento de la temperatura (274). Por otro lado, en la literatura aparece descrito que, con la edad, los niveles de expresión de estas proteínas y su capacidad funcional en la respuesta al estrés, se ven reducidos, lo que podría jugar un papel fundamental en la disfunción celular característica del envejecimiento influyendo en gran medida a las vías de señalización normales (179, 275). Sin embargo, estas diferencias deberían observarse en el resto de los híbridos generados. A pesar de que hoy en día se ha puesto de manifiesto la relación existente entre la variabilidad mitocondrial y la expresión de proteínas como las chaperonas, son necesarios más estudios funcionales que permitan conocer de qué manera estas mutaciones influyen en la relación núcleo-mitocondria y la expresión de estas proteínas.

Otro conjunto de proteínas disminuidas en los híbridos OA-J en comparación con los OA-H fueron *DUT* y *SOD*, implicadas mayormente en el metabolismo de nucleótidos y en la detoxificación de ROS, respectivamente. En este caso, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el objetivo 3 en el análisis de la producción de ROS, es posible que los híbridos OA-H presenten aumentadas estas proteínas en relación a los OA-J en respuesta al incremento significativo del estrés oxidativo observado mediante un aumento de la producción de O_2 . Además, como se ha descrito previamente, una de las consecuencias características del aumento de los ROS a nivel mitocondrial es el daño a nivel del genoma mitocondrial (76, 115, 128,

Objetivo 5

133, 170), por lo que posiblemente estas células presenten niveles de expresión de *DUT* elevados en relación al aumento del daño celular, ya que esta proteína hidroliza las moléculas dUTP a dUMP que es un precursor de la síntesis de nucleótido de timinas, provocando la disminución de la acumulación de dUTP que puede resultar en la fragmentación de ADN y en la muerte celular (276).

A la hora de tener en cuenta el efecto de la enfermedad en los cíbridos portadores del haplogrupo de ADNmt H, se observó que los OA presentan niveles de expresión de proteínas como *HSPE1*, *DUT*, *C1QBP*, *SOD1* y *TIMM8A* incrementados. Resultado que es esperable ya que como se ha descrito anteriormente, todas estas proteínas se encuentran implicadas en procesos de respuesta y reparación frente a factores típicos de la enfermedad como la disfunción mitocondrial, el daño genético, el estrés oxidativo o la apoptosis y muerte celular (79, 80, 88, 98, 152, 154). Por su parte, el análisis del efecto de la enfermedad en los cíbridos portadores del haplogrupo J reflejó que los OA presentan niveles disminuidos de *HSPE1* y *DUT*, lo que llama la atención puesto que, como se vio anteriormente, son proteínas esenciales en la comunicación retrógrada entre el núcleo y la mitocondria y como sistema de reparación del daño a nivel genético. Una posible explicación a esta discordancia podría residir en la configuración de mutaciones características del haplogrupo de ADNmt J, ya que como se ha visto a lo largo de este trabajo de tesis, parecen jugar un papel relevante en los mecanismos de protección de la célula. Los cíbridos portadores de este haplogrupo de ADNmt mostraron una respuesta metabólica más flexible, con mayor capacidad de adaptación y respuesta frente a factores que influyen en el desarrollo de la OA y que afectan en procesos de reparación del daño celular.

A pesar de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este objetivo, es necesario tener en cuenta que son datos preliminares. Un siguiente paso muy importante sería la comprobación de la expresión de estas proteínas mediante técnicas de *WB* para corroborar la expresión diferencial observada entre los grupos

Objetivo 5

a estudio, además esta técnica nos permitiría estudiar en mayor profundidad la modulación de estas proteínas bajo otras condiciones de cultivo celular. Sin embargo, a partir de estos resultados se abren multitud de nuevas posibilidades a la hora de analizar el efecto funcional que los haplogrupos de ADNmt pueden tener a nivel celular y de qué manera son capaces de desarrollar mecanismos de defensa frente al progreso y avance de esta patología.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Conclusión general relativa a la hipótesis de trabajo:

Los cíbridos transmitocondriales parecen representar un modelo celular *in vitro* útil para el estudio de la función mitocondrial en la patología artrósica.

Conclusiones relativas al objetivo 1:

1. El compuesto que mostró la mejor capacidad de disminuir el número de copias de ADNmt de las células fue el **d4t, deplecionando este genoma y generando células *Rho-0***.
2. La caracterización funcional de la mitocondria, su distribución y los niveles de respiración mitocondriales mostraron que las **3a6 *Rho-0* y las T/C-28a2 *Rho-0* tienen el mismo comportamiento que una línea *Rho-0* estándar (143B.TK- *Rho-0*)**.

Conclusiones relativas al objetivo 2:

1. Todos los **cíbridos** generados incorporaron el ADNmt de los donantes portadores de los haplogrupos de ADNmt H y J.
2. Los **cíbridos** generados **estabilizaron su número de copias de ADNmt** alrededor de los 25-30 pases de cultivo. **No mostraron cambios fenotípicos** y reflejaron una **tasa de crecimiento similar** bajo las diferentes condiciones de cultivo.
3. Los **cíbridos OA** mostraron una actividad **menor de la CS** y únicamente reflejaron una **mayor actividad en el complejo V**, cuando se eliminó el piruvato del medio.
4. Los cíbridos OA reflejaron un **defecto en la función mitocondrial**, ya que mostraron una **menor masa mitocondrial, un menor potencial de membrana mitocondrial y una biogénesis disminuida**.

Conclusiones relativas al objetivo 3:

1. Los **cíbridos OA** mostraron una **función mitocondrial deficiente** reflejada como menor respiración mitocondrial.
2. Los cíbridos OA produjeron **mayores niveles de O₂- mitocondrial** y presentaron una **peor respuesta frente a estímulos** relacionados con el estrés oxidativo.
3. Los cíbridos OA fueron **más susceptibles a la muerte** celular bajo un **escenario inflamatorio**.
4. Los cíbridos OA mostraron un **mecanismo de autofagia deficiente**.

Conclusiones relativas al objetivo 4:

1. Los **cíbridos OA** son **menos glucolíticos** que los cíbridos N.
2. Los cíbridos OA presentaron el **metabolismo alterado** ya que dirigen la mayoría de los sustratos a la fosforilación oxidativa mitocondrial.
3. Los cíbridos OA tienen **reducida la flexibilidad metabólica**, mostrando una mayor preferencia por el metabolismo de los ácidos grasos.
4. Los cíbridos OA reflejaron **una mayor acumulación** de ácidos grasos en forma de **gotas lipídicas**.

Conclusiones relativas al objetivo 5:

1. Un total de **601 proteínas se identificaron** con al menos dos péptidos, de las cuales, la mayoría están implicadas en actividad enzimática y catabólica.
2. De las **78 proteínas** identificadas y **relacionadas con la función mitocondrial**, únicamente 11 se expresaron de manera diferencial entre los grupos analizados. Dentro de las que presentaron una expresión disminuida destacan las relacionadas con el ensamblaje, transporte y eliminación de otras moléculas relacionadas con el correcto funcionamiento del metabolismo mitocondrial.

General conclusion relative to work hypothesis:

Transmitochondrial cybrids are a useful *in vitro* model to study the role of mitochondria in OA.

Conclusions related to objective 1:

1. **D4t** was the compound with the greatest effect to **decrease mitochondrial copy number** in cell lines; showing the ability to reduce mitochondrial content and generate *Rho-0* cells.
2. The study of mitochondrial function, network distribution and respiration levels showed that **3a6 *Rho-0* and T/C-28a2 *Rho-0* cells had the same properties as a typical *Rho-0* cell line (143B.TK- *Rho-0*).**

Conclusions related to objective 2:

1. **Obtained cybrids incorporated the mtDNA from N and OA donors carrying the mtDNA haplogroups H and J.**
2. **Cybrids stabilized their mitochondrial copy number** around 25-30 passages, **showing a similar growth rate** up to the first 48 h and **no morphologic changes** under several culturing conditions.
3. **OA cybrids had lower CS activity.** The mitochondrial complexes activity only was **higher at complex V** when pyruvate was removed.
4. OA cybrids had a **lower mitochondrial mass, mitochondrial membrane potential and biogenesis**, reflecting a **defect in mitochondrial function.**

Conclusions related to objective 3:

1. **OA cybrids showed a lower mitochondrial respiration** reflecting a **lower mitochondrial functionality.**

2. OA cybrids had **higher O₂⁻ production levels** and an **impaired cellular response to stimuli** related to oxidative stress.
3. OA cybrids were **more susceptible to cell death** under an **inflammatory and oxidant environment**.
4. OA cybrids showed a **non-effective autophagy mechanism**.

Conclusions related to objective 4:

1. **OA cybrids** were **less glycolytic**.
2. OA cybrids had an **impaired metabolism**, due that most of the substrates were driven through oxidative phosphorylation instead of glycolysis.
3. OA cybrids had **reduced metabolic flexibility**, reflected by a higher preference for fatty acid metabolism.
4. OA cybrids showed a **higher accumulation** of fatty acids in form of **lipid droplets**.

Conclusions related to objective 5:

1. **601 proteins** mainly involved in enzyme and catabolic activity, **were identified** with at least two peptides.
2. **11 proteins** related to **mitochondrial function** were **expressed differentially** between the studied groups. The **downregulated proteins** were mainly implicated in structure and protein folding, transport and cleavage of other molecules, which **are necessary for the correct function of mitochondrial metabolism**.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019;393(10182):1745-59.
2. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1545-602.
3. Kingsbury SR, Gross HJ, Isherwood G, Conaghan PG. Osteoarthritis in Europe: impact on health status, work productivity and use of pharmacotherapies in five European countries. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(5):937-47.
4. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ*. 2003;81(9):646-56.
5. Blanco FJ. Osteoarthritis and atherosclerosis in joint disease". *Reumatol Clin*. 2018;14(5):251-3.
6. Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. Osteoarthritis. *Lancet*. 2015;386(9991):376-87.
7. Hiligsmann M, Cooper C, Arden N, Boers M, Branco JC, Luisa Brandi M, et al. Health economics in the field of osteoarthritis: an expert's consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin Arthritis Rheum*. 2013;43(3):303-13.
8. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(8):1233-41.
9. Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox Biol*. 2014;2:619-31.
10. Bacman SR, Moraes CT. Transmitochondrial technology in animal cells. *Methods Cell Biol*. 2007;80:503-24.
11. Kukat A, Kukat C, Brocher J, Schafer I, Krohne G, Trounce IA, et al. Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(7):e44.
12. King MP, Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol*. 1996;264:304-13.
13. Wiseman A, Attardi G. Reversible tenfold reduction in mitochondria DNA content of human cells treated with ethidium bromide. *Mol Gen Genet*. 1978;167(1):51-63.
14. Hashiguchi K, Zhang-Akiyama QM. Establishment of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Mol Biol*. 2009;554:383-91.
15. Nelson I, Hanna MG, Wood NW, Harding AE. Depletion of mitochondrial DNA by ddC in untransformed human cell lines. *Somat Cell Mol Genet*. 1997;23(4):287-90.
16. Inoue K, Ito S, Takai D, Soejima A, Shisa H, LePecq JB, et al. Isolation of mitochondrial DNA-less mouse cell lines and their application for trapping mouse synaptosomal mitochondrial DNA with deletion mutations. *J Biol Chem*. 1997;272(24):15510-5.

17. Schubert S, Heller S, Loffler B, Schafer I, Seibel M, Villani G, et al. Generation of Rho Zero Cells: Visualization and Quantification of the mtDNA Depletion Process. *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):9850-65.
18. Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(11):a021220.
19. Ryzhkova AI, Sazonova MA, Sinyov VV, Galitsyna EV, Chicheva MM, Melnichenko AA, et al. Mitochondrial diseases caused by mtDNA mutations: a mini-review. *Ther Clin Risk Manag.* 2018;14:1933-42.
20. Srivastava S, Moraes CT. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum Mol Genet.* 2001;10(26):3093-9.
21. Bacman SR, Williams SL, Pinto M, Peralta S, Moraes CT. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med.* 2013;19(9):1111-3.
22. Gammage PA, Viscomi C, Simard ML, Costa ASH, Gaude E, Powell CA, et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo. *Nat Med.* 2018;24(11):1691-5.
23. Sobenin IA, Zhelankin AV, Khasanova ZB, Sinyov VV, Medvedeva LV, Sagaidak MO, et al. Heteroplasmic Variants of Mitochondrial DNA in Atherosclerotic Lesions of Human Aortic Intima. *Biomolecules.* 2019;9(9).
24. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science.* 1989;246(4929):500-3.
25. Wojewoda M, Duszyński J, Szczepanowska J. NARP mutation and mtDNA depletion trigger mitochondrial biogenesis which can be modulated by selenite supplementation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(8):1178-86.
26. Walczak J, Partyka M, Duszyński J, Szczepanowska J. Implications of mitochondrial network organization in mitochondrial stress signalling in NARP cybrid and Rho0 cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):14864.
27. Sazonova MA, Sinyov VV, Ryzhkova AI, Galitsyna EV, Melnichenko AA, Postnov AY, et al. Cybrid Models of Pathological Cell Processes in Different Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:4647214.
28. Kim GJ, Park SY, Kim H, Chun YH, Park SH. Chromosomal aberrations in neuroblastoma cell lines identified by cross species color banding and chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;129(1):10-6.
29. Cohen N, Betts DR, Rechavi G, Amariglio N, Trakhtenbrot L. Clonal expansion and not cell interconversion is the basis for the neuroblast and nonneuronal types of the SK-N-SH neuroblastoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;143(1):80-4.
30. Tsai CC, Chen CL, Liu HC, Lee YT, Wang HW, Hou LT, et al. Overexpression of hTERT increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines. *J Biomed Sci.* 2010;17:64.

31. Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, et al. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest.* 1994;94(6):2307-16.
32. Gear AR. Rhodamine 6G. A potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Biol Chem.* 1974;249(11):3628-37.
33. Miyako K, Kai Y, Irie T, Takeshige K, Kang D. The content of intracellular mitochondrial DNA is decreased by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+). *J Biol Chem.* 1997;272(15):9605-8.
34. Lewis W, Dalakas MC. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nat Med.* 1995;1(5):417-22.
35. Hoschele D. Cell culture models for the investigation of NRTI-induced mitochondrial toxicity. Relevance for the prediction of clinical toxicity. *Toxicol In Vitro.* 2006;20(5):535-46.
36. Lynx MD, LaClair DD, McKee EE. Effects of zidovudine and stavudine on mitochondrial DNA of differentiating 3T3-F442a cells are not associated with imbalanced deoxynucleotide pools. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(3):1252-5.
37. Pontarin G, Ferraro P, Valentino ML, Hirano M, Reichard P, Bianchi V. Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Biol Chem.* 2006;281(32):22720-8.
38. Higuti T, Niimi S, Saito R, Nakasima S, Ohe T, Tani I, et al. Rhodamine 6G, inhibitor of both H⁺-ejections from mitochondria energized with ATP and with respiratory substrates. *Biochim Biophys Acta.* 1980;593(2):463-7.
39. Ziegler ML, Davidson RL. Elimination of mitochondrial elements and improved viability in hybrid cells. *Somatic Cell Genet.* 1981;7(1):73-88.
40. Trounce I, Wallace DC. Production of transmitochondrial mouse cell lines by cybrid rescue of rhodamine-6G pre-treated L-cells. *Somat Cell Mol Genet.* 1996;22(1):81-5.
41. Williams AJ, Murrell M, Brammah S, Minchenko J, Christodoulou J. A novel system for assigning the mode of inheritance in mitochondrial disorders using cybrids and rhodamine 6G. *Hum Mol Genet.* 1999;8(9):1691-7.
42. Cho YM, Kim JH, Kim M, Park SJ, Koh SH, Ahn HS, et al. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria to the cells with virtually no mitochondrial function but not with pathogenic mtDNA mutations. *PLoS One.* 2012;7(3):e32778.
43. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med.* 2014;12:8.
44. Miyako K, Irie T, Muta T, Umeda S, Kai Y, Fujiwara T, et al. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) selectively inhibits the replication of mitochondrial DNA. *Eur J Biochem.* 1999;259(1-2):412-8.
45. Umeda S, Muta T, Ohsato T, Takamatsu C, Hamasaki N, Kang D. The D-loop structure of human mtDNA is destabilized directly by 1-methyl-4-

- phenylpyridinium ion (MPP⁺), a parkinsonism-causing toxin. *Eur J Biochem.* 2000;267(1):200-6.
46. Martin JL, Brown CE, Matthews-Davis N, Reardon JE. Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and mitochondrial DNA synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(12):2743-9.
47. Song S, Wheeler LJ, Mathews CK. Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J Biol Chem.* 2003;278(45):43893-6.
48. Song S, Pursell ZF, Copeland WC, Longley MJ, Kunkel TA, Mathews CK. DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(14):4990-5.
49. Lund KC, Peterson LL, Wallace KB. Absence of a universal mechanism of mitochondrial toxicity by nucleoside analogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(7):2531-9.
50. Saitoh A, Haas RH, Naviaux RK, Salva NG, Wong JK, Spector SA. Impact of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on mitochondrial DNA and RNA in human skeletal muscle cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(8):2825-30.
51. Komarov AM, Hall JM, Weglicki WB. Azidothymidine promotes free radical generation by activated macrophages and hydrogen peroxide-iron-mediated oxidation in a cell-free system. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1688(3):257-64.
52. Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J.* 2000;348 Pt 2:425-32.
53. Wei YH, Lee CF, Lee HC, Ma YS, Wang CW, Lu CY, et al. Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4,977 BP-deleted mitochondrial DNA. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:97-112.
54. Stankov MV, Lucke T, Das AM, Schmidt RE, Behrens GM. Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain activity in primary human subcutaneous adipocytes treated with nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):280-7.
55. Fernandez-Moreno M, Hermida-Gomez T, Gallardo ME, Dalmao-Fernandez A, Rego-Perez I, Garesse R, et al. Generating Rho-0 Cells Using Mesenchymal Stem Cell Lines. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164199.
56. Qian W, Van Houten B. Alterations in bioenergetics due to changes in mitochondrial DNA copy number. *Methods.* 2010;51(4):452-7.
57. Wojewoda M, Duszynski J, Wieckowski M, Szczepanowska J. Effect of selenite on basic mitochondrial function in human osteosarcoma cells with chronic mitochondrial stress. *Mitochondrion.* 2012;12(1):149-55.

58. Spadafora D, Kozhukhar N, Chouljenko VN, Kousoulas KG, Alexeyev MF. Methods for Efficient Elimination of Mitochondrial DNA from Cultured Cells. *PLoS One*. 2016;11(5):e0154684.
59. Chomyn A. Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells. *Methods Enzymol*. 1996;264:334-9.
60. Carelli V, Vergani L, Bernazzi B, Zampieron C, Bucchi L, Valentino M, et al. Respiratory function in cybrid cell lines carrying European mtDNA haplogroups: implications for Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1588(1):7-14.
61. Chomyn A, Lai ST, Shakeley R, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA^{Lys} mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet*. 1994;54(6):966-74.
62. De la Mata M, Garrido-Maraver J, Cotan D, Cordero MD, Oropesa-Avila M, Izquierdo LG, et al. Recovery of MERRF fibroblasts and cybrids pathophysiology by coenzyme Q10. *Neurotherapeutics*. 2012;9(2):446-63.
63. Appukuttan TA, Ali N, Varghese M, Singh A, Tripathy D, Padmakumar M, et al. Parkinson's disease cybrids, differentiated or undifferentiated, maintain morphological and biochemical phenotypes different from those of control cybrids. *J Neurosci Res*. 2013;91(7):963-70.
64. Silva DF, Santana I, Esteves AR, Baldeiras I, Arduino DM, Oliveira CR, et al. Prodromal metabolic phenotype in MCI cybrids: implications for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10(2):180-90.
65. Blanco-Grau A, Bonaventura-Ibars I, Coll-Canti J, Melia MJ, Martinez R, Martinez-Gallo M, et al. Identification and biochemical characterization of the novel mutation m.8839G>C in the mitochondrial ATP6 gene associated with NARP syndrome. *Genes Brain Behav*. 2013;12(8):812-20.
66. Cruz-Bermudez A, Vicente-Blanco RJ, Hernandez-Sierra R, Montero M, Alvarez J, Gonzalez Manrique M, et al. Functional Characterization of Three Concomitant MtDNA LHON Mutations Shows No Synergistic Effect on Mitochondrial Activity. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146816.
67. Cruz-Bermudez A, Vicente-Blanco RJ, Gonzalez-Vioque E, Provencio M, Fernandez-Moreno MA, Garesse R. Spotlight on the relevance of mtDNA in cancer. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(4):409-18.
68. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Pavlis JM, Falatoonzadeh P, Ramirez C, et al. Mitochondrial DNA variants mediate energy production and expression levels for CFH, C3 and EFEMP1 genes: implications for age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2013;8(1):e54339.
69. Nashine S, Cohen P, Chwa M, Lu S, Nesburn AB, Kuppermann BD, et al. Humanin G (HNG) protects age-related macular degeneration (AMD) transmitochondrial ARPE-19 cybrids from mitochondrial and cellular damage. *Cell Death Dis*. 2017;8(7):e2951.

70. Li D, Sun Y, Zhuang Q, Song Y, Wu B, Jia Z, et al. Mitochondrial dysfunction caused by m.2336T>C mutation with hypertrophic cardiomyopathy in cybrid cell lines. *Mitochondrion*. 2018.
71. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1697-707.
72. Blanco FJ, Rego-Perez I. Editorial: Is it time for epigenetics in osteoarthritis? *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(9):2324-7.
73. Green JA, Hirst-Jones KL, Davidson RK, Jupp O, Bao Y, MacGregor AJ, et al. The potential for dietary factors to prevent or treat osteoarthritis. *Proc Nutr Soc*. 2014;73(2):278-88.
74. Silverwood V, Blagojevic-Bucknall M, Jinks C, Jordan JL, Protheroe J, Jordan KP. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(4):507-15.
75. Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(7):412-20.
76. Reed KN, Wilson G, Pearsall A, Grishko VI. The role of mitochondrial reactive oxygen species in cartilage matrix destruction. *Mol Cell Biochem*. 2014;397(1-2):195-201.
77. Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(4):576-91.
78. Snochowska A, Szmigielska P, Brzezianska-Lasota E, Tomaszewski W. Genetic and Epigenetic Interactions in the Etiopathogenesis of Osteoarthritis. Selected Molecular Factors in OA Etiopathogenesis. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2017;19(3):227-37.
79. Rego-Perez I, Duran-Sotuela A, Ramos-Louro P, Blanco FJ. Mitochondrial Genetics and Epigenetics in Osteoarthritis. *Front Genet*. 2019;10:1335.
80. Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(3):161-9.
81. Bolduc JA, Collins JA, Loeser RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2019;132:73-82.
82. Zhai G. Alteration of Metabolic Pathways in Osteoarthritis. *Metabolites*. 2019;9(1).
83. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;1(6):461-8.
84. Yang X, Chen W, Zhao X, Chen L, Li W, Ran J, et al. Pyruvate Kinase M2 Modulates the Glycolysis of Chondrocyte and Extracellular Matrix in Osteoarthritis. *DNA Cell Biol*. 2018;37(3):271-7.
85. Liu H, Li Z, Cao Y, Cui Y, Yang X, Meng Z, et al. Effect of chondrocyte mitochondrial dysfunction on cartilage degeneration: A possible pathway for osteoarthritis pathology at the subcellular level. *Mol Med Rep*. 2019;20(4):3308-16.
86. Lane RS, Fu Y, Matsuzaki S, Kinter M, Humphries KM, Griffin TM. Mitochondrial respiration and redox coupling in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:54.

87. Garcia-Carbonell R, Divakaruni AS, Lodi A, Vicente-Suarez I, Saha A, Cheroutre H, et al. Critical Role of Glucose Metabolism in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocytes. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(7):1614-26.
88. Wang Y, Zhao X, Lotz M, Terkeltaub R, Liu-Bryan R. Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritis chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(8):2141-53.
89. Wang C, Silverman RM, Shen J, O'Keefe RJ. Distinct metabolic programs induced by TGF-beta1 and BMP2 in human articular chondrocytes with osteoarthritis. *J Orthop Translat.* 2018;12:66-73.
90. Masuda I, Koike M, Nakashima S, Mizutani Y, Ozawa Y, Watanabe K, et al. Apple procyanidins promote mitochondrial biogenesis and proteoglycan biosynthesis in chondrocytes. *Sci Rep.* 2018;8(1):7229.
91. Mobasheri A, Rayman MP, Gualillo O, Sellam J, van der Kraan P, Fearon U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(5):302-11.
92. Larsen S, Diez-Sanchez C, Rabol R, Ara I, Dela F, Helge JW. Increased intrinsic mitochondrial function in humans with mitochondrial haplogroup H. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1837(2):226-31.
93. Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardo E, Diez-Sanchez C, Montoya J, Lopez-Perez MJ, et al. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet.* 2010;19(17):3343-53.
94. Luchini C, Nottegar A, Vaona A, Stubbs B, Demurtas J, Maggi S, et al. Female-specific association among I, J and K mitochondrial genetic haplogroups and cancer: A longitudinal cohort study. *Cancer Genet.* 2018;224-225:29-36.
95. Valdes AM, Goldring MB. Mitochondrial DNA haplogroups and ageing mechanisms in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 76. England 2017. p. 939-41.
96. Kuo HM, Weng SW, Chang AY, Huang HT, Lin HY, Chuang JH, et al. Altered mitochondrial dynamics and response to insulin in cybrid cells harboring a diabetes-susceptible mitochondrial DNA haplogroup. *Free Radic Biol Med.* 2016;96:116-29.
97. van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, et al. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2003;72(4):804-11.
98. 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):2387-96.
99. Rego I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Lopez C, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A, Arenas J, et al. Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(1):210-3.

100. Soto-Hermida A, Fernandez-Moreno M, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, Rego-Perez I, Blanco FJ. mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *Mitochondrion*. 2014;15:18-23.
101. Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Vazquez-Mosquera ME, Cortes-Pereira E, Relano S, Hermida-Gomez T, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence the risk of incident knee osteoarthritis in OAI and CHECK cohorts. A meta-analysis and functional study. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):1114-22.
102. Amo T, Yadava N, Oh R, Nicholls DG, Brand MD. Experimental assessment of bioenergetic differences caused by the common European mitochondrial DNA haplogroups H and T. *Gene*. 2008;411(1-2):69-76.
103. Mueller EE, Brunner SM, Mayr JA, Stanger O, Sperl W, Kofler B. Functional differences between mitochondrial haplogroup T and haplogroup H in HEK293 cybrid cells. *PLoS One*. 2012;7(12):e52367.
104. Holiday ER. Spectrophotometry of proteins: Absorption spectra of tyrosine, tryptophan and their mixtures. II. Estimation of tyrosine and tryptophan in proteins. *Biochem J*. 1936;30(10):1795-803.
105. DiMauro S, Servidei S, Zeviani M, DiRocco M, DeVivo DC, DiDonato S, et al. Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. *Ann Neurol*. 1987;22(4):498-506.
106. Medja F, Allouche S, Frachon P, Jardel C, Malgat M, Mousson de Camaret B, et al. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion*. 2009;9(5):331-9.
107. Nijtmans LG, Henderson NS, Holt IJ. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods*. 2002;26(4):327-34.
108. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):671-5.
109. Omura S, Iwai Y, Hirano A, Nakagawa A, Awaya J, Tsuchya H, et al. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. 1977;30(4):275-82.
110. Ruegg UT, Burgess GM. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci*. 1989;10(6):218-20.
111. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
112. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
113. Rosa SC, Goncalves J, Judas F, Mobasher A, Lopes C, Mendes AF. Impaired glucose transporter-1 degradation and increased glucose transport and oxidative stress in response to high glucose in chondrocytes from osteoarthritic versus normal human cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):R80.
114. Wojtczak L. The Crabtree effect: a new look at the old problem. *Acta Biochim Pol*. 1996;43(2):361-8.
115. Lesnefsky EJ, Chen Q, Hoppel CL. Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circ Res*. 2016;118(10):1593-611.

116. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 1998;41(2):284-9.
117. Crawford A, Dickinson SC. Chondrocyte isolation, expansion, and culture on polymer scaffolds. *Methods Mol Biol.* 2004;238:147-58.
118. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 2010;47:69-84.
119. Wenz T. Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha under cellular stress. *Mitochondrion.* 2013;13(2):134-42.
120. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(7):1269-78.
121. Clay Montier LL, Deng JJ, Bai Y. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *J Genet Genomics.* 2009;36(3):125-31.
122. Shen JM, Feng L, Feng C. Role of mtDNA haplogroups in the prevalence of osteoarthritis in different geographic populations: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(10):e108896.
123. Rego-Perez I, Blanco FJ, Roemer FW, Guermazi A, Ran D, Ashbeck EL, et al. Mitochondrial DNA haplogroups associated with MRI-detected structural damage in early knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26(11):1562-9.
124. Keeney PM, Dunham LD, Quigley CK, Morton SL, Bergquist KE, Bennett JP, Jr. Cybrid models of Parkinson's disease show variable mitochondrial biogenesis and genotype-respiration relationships. *Exp Neurol.* 2009;220(2):374-82.
125. Blanco FJ, Lopez-Armada MJ, Maneiro E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion.* 2004;4(5-6):715-28.
126. Suissa S, Wang Z, Poole J, Wittkopp S, Feder J, Shutt TE, et al. Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS Genet.* 2009;5(5):e1000474.
127. Moraes CT. What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *Trends Genet.* 2001;17(4):199-205.
128. Malik D, Hsu T, Falatoonzadeh P, Caceres-del-Carpio J, Tarek M, Chwa M, et al. Human retinal transmitochondrial cybrids with J or H mtDNA haplogroups respond differently to ultraviolet radiation: implications for retinal diseases. *PLoS One.* 2014;9(2):e99003.
129. Strobbe D, Caporali L, Iommarini L, Maresca A, Montopoli M, Martinuzzi A, et al. Haplogroup J mitogenomes are the most sensitive to the pesticide rotenone: Relevance for human diseases. *Neurobiol Dis.* 2018;114:129-39.
130. Ma Y, Bai RK, Trieu R, Wong LJ. Mitochondrial dysfunction in human breast cancer cells and their transmitochondrial cybrids. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(1):29-37.
131. MacPherson S, Horkoff M, Gravel C, Hoffmann T, Zuber J, Lum JJ. STAT3 Regulation of Citrate Synthase Is Essential during the Initiation of Lymphocyte Cell Growth. *Cell Rep.* 2017;19(5):910-8.

132. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat.* 2009;30(2):E386-94.
133. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(4):822-34.
134. Doherty E, Perl A. Measurement of Mitochondrial Mass by Flow Cytometry during Oxidative Stress. *React Oxyg Species (Apex).* 2017;4(10):275-83.
135. Clutton G, Mollan K, Hudgens M, Goonetilleke N. A Reproducible, Objective Method Using MitoTracker(R) Fluorescent Dyes to Assess Mitochondrial Mass in T Cells by Flow Cytometry. *Cytometry A.* 2018.
136. Verma P, Singh A, Nthenge-Ngumbau DN, Rajamma U, Sinha S, Mukhopadhyay K, et al. Attention deficit-hyperactivity disorder suffers from mitochondrial dysfunction. *BBA Clin.* 2016;6:153-8.
137. Swerdlow RH, Koppel S, Weidling I, Hayley C, Ji Y, Wilkins HM. Mitochondria, Cybrids, Aging, and Alzheimer's Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;146:259-302.
138. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, et al. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(2):208-19.
139. Scarpulla RC. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1819(9-10):1088-97.
140. Agidigbi TS, Kim C. Reactive Oxygen Species in Osteoclast Differentiation and Possible Pharmaceutical Targets of ROS-Mediated Osteoclast Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14).
141. Roelofs BA, Ge SX, Studlack PE, Polster BM. Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV. *Free Radic Biol Med.* 2015;86:250-8.
142. Brand MD. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med.* 2016;100:14-31.
143. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004;279(47):49064-73.
144. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1-13.
145. Carelli V, Maresca A, Caporali L, Trifunov S, Zanna C, Rugolo M. Mitochondria: Biogenesis and mitophagy balance in segregation and clonal expansion of mitochondrial DNA mutations. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;63:21-4.
146. Liu JT, Guo X, Ma WJ, Zhang YG, Xu P, Yao JF, et al. Mitochondrial function is altered in articular chondrocytes of an endemic osteoarthritis, Kashin-Beck disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(9):1218-26.

147. Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):26035-54.
148. Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets.* 2007;8(2):333-45.
149. Li M, Gao P, Zhang J. Crosstalk between Autophagy and Apoptosis: Potential and Emerging Therapeutic Targets for Cardiac Diseases. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3):332.
150. Charlier E, Relic B, Deroyer C, Malaise O, Neuville S, Collee J, et al. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12).
151. Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AWt. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(1):107-13.
152. Blanco FJ, Rego-Perez I. Mitochondria and mitophagy: biosensors for cartilage degradation and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26(8):989-91.
153. Terkeltaub R, Johnson K, Murphy A, Ghosh S. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion.* 2002;1(4):301-19.
154. Carames B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(3):791-801.
155. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010;140(3):313-26.
156. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(9):579-93.
157. Luo P, Gao F, Niu D, Sun X, Song Q, Guo C, et al. The Role of Autophagy in Chondrocyte Metabolism and Osteoarthritis: A Comprehensive Research Review. *Biomed Res Int.* 2019;2019:5171602.
158. Goutas A, Syrrou C, Papathanasiou I, Tsezou A, Trachana V. The autophagic response to oxidative stress in osteoarthritic chondrocytes is deregulated. *Free Radic Biol Med.* 2018;126:122-32.
159. Melser S, Lavie J, Benard G. Mitochondrial degradation and energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853(10 Pt B):2812-21.
160. Lopez de Figueroa P, Lotz MK, Blanco FJ, Carames B. Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(4):966-76.
161. Wu H, Ying M, Hu X. Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget.* 2016;7(26):40621-9.
162. Deshwal S, Antonucci S, Kaludercic N, Di Lisa F. Measurement of Mitochondrial ROS Formation. *Methods Mol Biol.* 2018;1782:403-18.

163. Hassan GS. Menadione. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2013;38:227-313.
164. Biever A, Valjent E, Puighermanal E. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. Front Mol Neurosci. 2015;8:75.
165. Zhang FJ, Luo W, Lei GH. Role of HIF-1alpha and HIF-2alpha in osteoarthritis. Joint Bone Spine. 2015;82(3):144-7.
166. Chen R, Lai UH, Zhu L, Singh A, Ahmed M, Forsyth NR. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. Front Cell Dev Biol. 2018;6:132.
167. Cherry AD, Piantadosi CA. Regulation of mitochondrial biogenesis and its intersection with inflammatory responses. Antioxid Redox Signal. 2015;22(12):965-76.
168. Li YS, Xiao WF, Luo W. Cellular aging towards osteoarthritis. Mech Ageing Dev. 2017;162:80-4.
169. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev. 2007;87(1):315-424.
170. Lee HC, Yin PH, Lin JC, Wu CC, Chen CY, Wu CW, et al. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. Ann N Y Acad Sci. 2005;1042:109-22.
171. Moreno-Loshuertos R, Enriquez JA. Respiratory supercomplexes and the functional segmentation of the CoQ pool. Free Radic Biol Med. 2016;100:5-13.
172. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. Osteoarthritis Cartilage. 2003;11(10):747-55.
173. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? Osteoarthritis Cartilage. 2005;13(8):643-54.
174. Ramos-Ibeas P, Barandalla M, Colleoni S, Lazzari G. Pyruvate antioxidant roles in human fibroblasts and embryonic stem cells. Mol Cell Biochem. 2017;429(1-2):137-50.
175. Babich H, Liebling EJ, Burger RF, Zuckerbraun HL, Schuck AG. Choice of DMEM, formulated with or without pyruvate, plays an important role in assessing the in vitro cytotoxicity of oxidants and prooxidant nutraceuticals. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2009;45(5-6):226-33.
176. Giandomenico AR, Cerniglia GE, Biaglow JE, Stevens CW, Koch CJ. The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. Free Radic Biol Med. 1997;23(3):426-34.
177. Alvarez-Elizondo MB, Barenholz-Cohen T, Weihs D. Sodium pyruvate pre-treatment prevents cell death due to localised, damaging mechanical strains in the context of pressure ulcers. Int Wound J. 2019;16(5):1153-63.
178. Rizwan H, Pal S, Sabnam S, Pal A. High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes. Life Sci. 2020;241:117148.

179. Mobasher A, Bondy CA, Moley K, Mendes AF, Rosa SC, Richardson SM, et al. Facilitative glucose transporters in articular chondrocytes. Expression, distribution and functional regulation of GLUT isoforms by hypoxia, hypoxia mimetics, growth factors and pro-inflammatory cytokines. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2008;200:1 p following vi, -84.
180. Ahmed SM, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(2):585-97.
181. Buendia I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, Leon R. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther.* 2016;157:84-104.
182. Gavriilidis C, Miwa S, von Zglinicki T, Taylor RW, Young DA. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheum.* 2013;65(2):378-87.
183. Cheleschi S, Calamia V, Fernandez-Moreno M, Biava M, Giordani A, Fioravanti A, et al. In vitro comprehensive analysis of VA692 a new chemical entity for the treatment of osteoarthritis. *Int Immunopharmacol.* 2018;64:86-100.
184. Palma FR, He C, Danes JM, Paviani V, Coelho DR, Gantner BN, et al. Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch. *Antioxid Redox Signal.* 2020;32(10):701-14.
185. Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(4):R904-14.
186. Klotz LO, Hou X, Jacob C. 1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling. *Molecules.* 2014;19(9):14902-18.
187. Smolkova K, Miko E, Kovacs T, Leguina-Ruzzi A, Adrienn S, Bai P. NRF2 in regulating cancer metabolism. *Antioxid Redox Signal.* 2020.
188. Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol.* 2011;85(4):241-72.
189. Majiene D, Kuseliauskyte J, Stimbirys A, Jekabsone A. Comparison of the Effect of Native 1,4-Naphthoquinones Plumbagin, Menadione, and Lawsone on Viability, Redox Status, and Mitochondrial Functions of C6 Glioblastoma Cells. *Nutrients.* 2019;11(6).
190. Kavcic N, Pegan K, Vandenabeele P, Turk B. Comparative study of the differential cell death protecting effect of various ROS scavengers. *Biol Chem.* 2019;400(2):149-60.
191. Scanzello CR. Role of low-grade inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2017;29(1):79-85.
192. Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(10):580-92.

193. van den Bosch MHJ. Inflammation in osteoarthritis: is it time to dampen the alarm(in) in this debilitating disease? *Clin Exp Immunol.* 2019;195(2):153-66.
194. Lopez-Armada MJ, Carames B, Martin MA, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Fuentes-Boquete I, et al. Mitochondrial activity is modulated by TNFalpha and IL-1beta in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(10):1011-22.
195. Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:109-26.
196. Trocoli A, Djavaheri-Mergny M. The complex interplay between autophagy and NF-kappaB signaling pathways in cancer cells. *Am J Cancer Res.* 2011;1(5):629-49.
197. Muoio DM. Metabolic inflexibility: when mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. *Cell.* 2014;159(6):1253-62.
198. Liemburg-Apers DC, Willems PH, Koopman WJ, Grefte S. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Arch Toxicol.* 2015;89(8):1209-26.
199. Hessvik NP, Bakke SS, Fredriksson K, Boekschoten MV, Fjorckenstad A, Koster G, et al. Metabolic switching of human myotubes is improved by n-3 fatty acids. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2090-104.
200. Smith RL, Soeters MR, Wust RCI, Houtkooper RH. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocr Rev.* 2018;39(4):489-517.
201. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-14.
202. Galgani JE, Moro C, Ravussin E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(5):E1009-17.
203. Goodpaster BH, Sparks LM. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab.* 2017;25(5):1027-36.
204. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes.* 2000;49(5):677-83.
205. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(2):105-17.
206. Naik PP, Birbrair A, Bhutia SK. Mitophagy-driven metabolic switch reprograms stem cell fate. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(1):27-43.
207. Whitaker RM, Corum D, Beeson CC, Schnellmann RG. Mitochondrial Biogenesis as a Pharmacological Target: A New Approach to Acute and Chronic Diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;56:229-49.
208. Hidalgo-Lanussa O, Baez-Jurado E, Echeverria V, Ashraf GM, Sahebkar A, Garcia-Segura LM, et al. Lipotoxicity, neuroinflammation, glial cells and oestrogenic compounds. *J Neuroendocrinol.* 2020;32(1):e12776.
209. Engin AB. What Is Lipotoxicity? *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:197-220.
210. Blanco FJ, Valdes AM, Rego-Perez I. Mitochondrial DNA variation and the pathogenesis of osteoarthritis phenotypes. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(6):327-40.

211. Rocha B, Ruiz-Romero C, Blanco FJ. Mass spectrometry imaging: a novel technology in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(1):52-63.
212. Nazli SA, Loeser RF, Chubinskaya S, Willey JS, Yammani RR. High fat-diet and saturated fatty acid palmitate inhibits IGF-1 function in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(9):1516-21.
213. Villalvilla A, Gomez R, Largo R, Herrero-Beaumont G. Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):20793-808.
214. Cillero-Pastor B, Eijkel G, Kiss A, Blanco FJ, Heeren RM. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry-based molecular distribution distinguishing healthy and osteoarthritic human cartilage. *Anal Chem*. 2012;84(21):8909-16.
215. Masuko K, Murata M, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Nakamura H, et al. A metabolic aspect of osteoarthritis: lipid as a possible contributor to the pathogenesis of cartilage degradation. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27(2):347-53.
216. Amador E, Dorfman LE, Wacker WE. SERUM LACTIC DEHYDROGENASE ACTIVITY: AN ANALYTICAL ASSESSMENT OF CURRENT ASSAYS. *Clin Chem*. 1963;12:391-9.
217. Ulmer DD, Vallee BL, Wacker WE. Metalloenzymes and myocardial infarction. II. Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentrations in serum. *N Engl J Med*. 1956;255(10):450-6.
218. Wensaas AJ, Rustan AC, Lovstedt K, Kull B, Wikstrom S, Drevon CA, et al. Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation. *J Lipid Res*. 2007;48(4):961-7.
219. Skrede S, Bremer J, Berge RK, Rustan AC. Stimulation of fatty acid oxidation by a 3-thia fatty acid reduces triacylglycerol secretion in cultured rat hepatocytes. *J Lipid Res*. 1994;35(8):1395-404.
220. Bell JA, Reed MA, Consitt LA, Martin OJ, Haynie KR, Hulver MW, et al. Lipid partitioning, incomplete fatty acid oxidation, and insulin signal transduction in primary human muscle cells: effects of severe obesity, fatty acid incubation, and fatty acid translocase/CD36 overexpression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(7):3400-10.
221. Hildyard JC, Ammala C, Dukes ID, Thomson SA, Halestrap AP. Identification and characterisation of a new class of highly specific and potent inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1707(2-3):221-30.
222. Zhong Y, Li X, Yu D, Li Y, Long Y, Yuan Y, et al. Application of mitochondrial pyruvate carrier blocker UK5099 creates metabolic reprogram and greater stem-like properties in LnCap prostate cancer cells in vitro. *Oncotarget*. 2015;6(35):37758-69.
223. Rupp H, Zarain-Herzberg A, Maisch B. The use of partial fatty acid oxidation inhibitors for metabolic therapy of angina pectoris and heart failure. *Hebdomada*. 2002;27(7):621-36.

224. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
225. Gaster M, Rustan AC, Aas V, Beck-Nielsen H. Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: evidence from cultured myotubes. *Diabetes*. 2004;53(3):542-8.
226. Spandl J, White DJ, Peychl J, Thiele C. Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540. *Traffic*. 2009;10(11):1579-84.
227. Wu L, Liu H, Li L, Cheng Q, Li H, Huang H. Mitochondrial pathology in osteoarthritic chondrocytes. *Curr Drug Targets*. 2014;15(7):710-9.
228. Fillmore N, Lopaschuk GD. Targeting mitochondrial oxidative metabolism as an approach to treat heart failure. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(4):857-65.
229. Nagampalli RSK, Quesnay JEN, Adamoski D, Islam Z, Birch J, Sebinelli HG, et al. Human mitochondrial pyruvate carrier 2 as an autonomous membrane transporter. *Sci Rep*. 2018;8(1):3510.
230. Rossi A, Rigotto G, Valente G, Giorgio V, Basso E, Filadi R, et al. Defective Mitochondrial Pyruvate Flux Affects Cell Bioenergetics in Alzheimer's Disease-Related Models. *Cell Rep*. 2020;30(7):2332-48.e10.
231. Feng J, Ma Y, Chen Z, Hu J, Yang Q, Ding G. Mitochondrial pyruvate carrier 2 mediates mitochondrial dysfunction and apoptosis in high glucose-treated podocytes. *Life Sci*. 2019;237:116941.
232. Veriter S, Aouassar N, Adnet PY, Paridaens MS, Stuckman C, Jordan B, et al. The impact of hyperglycemia and the presence of encapsulated islets on oxygenation within a bioartificial pancreas in the presence of mesenchymal stem cells in a diabetic Wistar rat model. *Biomaterials*. 2011;32(26):5945-56.
233. Lafosse A, Dufey C, Beauloye C, Horman S, Dufrane D. Impact of Hyperglycemia and Low Oxygen Tension on Adipose-Derived Stem Cells Compared with Dermal Fibroblasts and Keratinocytes: Importance for Wound Healing in Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168058.
234. Li YM, Schilling T, Benisch P, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, et al. Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;363(1):209-15.
235. Huynh FK, Green MF, Koves TR, Hirschey MD. Measurement of fatty acid oxidation rates in animal tissues and cell lines. *Methods Enzymol*. 2014;542:391-405.
236. Lee RB, Urban JP. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J*. 1997;321 (Pt 1):95-102.
237. Audano M, Pedretti S, Crestani M, Caruso D, De Fabiani E, Mitro N. Mitochondrial dysfunction increases fatty acid beta-oxidation and translates into impaired neuroblast maturation. *FEBS Lett*. 2019;593(22):3173-89.
238. Flaquer A, Baumbach C, Ladwig KH, Kriebel J, Waldenberger M, Grallert H, et al. Mitochondrial genetic variants identified to be associated with posttraumatic stress disorder. *Transl Psychiatry*. 2015;5:e524.

239. Jin Y, Tan Y, Chen L, Liu Y, Ren Z. Reactive Oxygen Species Induces Lipid Droplet Accumulation in HepG2 Cells by Increasing Perilipin 2 Expression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11).
240. Youle RJ, van der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012;337(6098):1062-5.
241. Mourier A, Motori E, Brandt T, Lagouge M, Atanassov I, Galinier A, et al. Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels. *J Cell Biol.* 2015;208(4):429-42.
242. Yang L, Long Q, Liu J, Tang H, Li Y, Bao F, et al. Mitochondrial fusion provides an 'initial metabolic complementation' controlled by mtDNA. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(13):2585-98.
243. Ahmad IM, Aykin-Burns N, Sim JE, Walsh SA, Higashikubo R, Buettner GR, et al. Mitochondrial O₂^{*}- and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4254-63.
244. Li H, Chen J, Li B, Fang X. The protective effects of dulaglutide against advanced glycation end products (AGEs)-induced degradation of type collagen and aggrecan in human SW1353 chondrocytes. *Chem Biol Interact.* 2020;322:108968.
245. Gao YH, Zhao CW, Liu B, Dong N, Ding L, Li YR, et al. An update on the association between metabolic syndrome and osteoarthritis and on the potential role of leptin in osteoarthritis. *Cytokine.* 2020;129:155043.
246. Zhang Y, Huang X, Yuan Y. Linagliptin protects human chondrogenic ATDC5 cells against advanced glycation end products (AGEs)-induced apoptosis via a mitochondria-dependent pathway. *Chem Biol Interact.* 2020;315:108901.
247. Tong C, Liang H, Liu X, Yuan B, Xue B, Tong Z, et al. The protective effects of exenatide against AGEs-induced articular matrix degradation in human primary chondrocytes. *Am J Transl Res.* 2019;11(4):2081-9.
248. Castro-Perez JM, Kamphorst J, DeGroot J, Lafeber F, Goshawk J, Yu K, et al. Comprehensive LC-MS E lipidomic analysis using a shotgun approach and its application to biomarker detection and identification in osteoarthritis patients. *J Proteome Res.* 2010;9(5):2377-89.
249. Lippiello L, Walsh T, Fienhold M. The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. *Metabolism.* 1991;40(6):571-6.
250. Feng YZ, Lund J, Li Y, Knabenes IK, Bakke SS, Kase ET, et al. Loss of perilipin 2 in cultured myotubes enhances lipolysis and redirects the metabolic energy balance from glucose oxidation towards fatty acid oxidation. *J Lipid Res.* 2017;58(11):2147-61.
251. Soto-Hermida A, Fernandez-Moreno M, Pertega-Diaz S, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, Blanco FJ, et al. Mitochondrial DNA haplogroups modulate the radiographic progression of Spanish patients with osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2015;35(2):337-44.

252. Aretz I, Hardt C, Wittig I, Meierhofer D. An Impaired Respiratory Electron Chain Triggers Down-regulation of the Energy Metabolism and De-ubiquitination of Solute Carrier Amino Acid Transporters. *Mol Cell Proteomics*. 2016;15(5):1526-38.
253. Chevallet M, Lescuyer P, Diemer H, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T. Alterations of the mitochondrial proteome caused by the absence of mitochondrial DNA: A proteomic view. *Electrophoresis*. 2006;27(8):1574-83.
254. Musicco C, Cormio A, Calvaruso MA, Iommarini L, Gasparre G, Porcelli AM, et al. Analysis of the mitochondrial proteome of cybrid cells harbouring a truncative mitochondrial DNA mutation in respiratory complex I. *Mol Biosyst*. 2014;10(6):1313-9.
255. Moore JB, Weeks ME. Proteomics and systems biology: current and future applications in the nutritional sciences. *Adv Nutr*. 2011;2(4):355-64.
256. Cervantes-Gracia K, Husi H. Integrative analysis of Multiple Sclerosis using a systems biology approach. *Sci Rep*. 2018;8(1):5633.
257. Carnielli CM, Winck FV, Paes Leme AF. Functional annotation and biological interpretation of proteomics data. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854(1):46-54.
258. Boersema PJ, Kahraman A, Picotti P. Proteomics beyond large-scale protein expression analysis. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;34:162-70.
259. de Souza N, Picotti P. Mass spectrometry analysis of the structural proteome. *Curr Opin Struct Biol*. 2019;60:57-65.
260. Hashimoto Y, Greco TM, Cristea IM. Contribution of Mass Spectrometry-Based Proteomics to Discoveries in Developmental Biology. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1140:143-54.
261. Rabilloud T, Brodard V, Peltre G, Righetti PG, Ettori C. Modified silver staining for immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1992;13(4):264-6.
262. Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D1251-7.
263. Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 2008;134(1):112-23.
264. Ruan L, Wang Y, Zhang X, Tomaszewski A, McNamara JT, Li R. Mitochondria-Associated Proteostasis. *Annu Rev Biophys*. 2020.
265. Dzeja P, Terzic A. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int J Mol Sci*. 2009;10(4):1729-72.
266. David S, Bucchieri F, Corrao S, Czarnecka AM, Campanella C, Farina F, et al. Hsp10: anatomic distribution, functions, and involvement in human disease. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2013;5:768-78.
267. Reid KBM. Complement Component C1q: Historical Perspective of a Functionally Versatile, and Structurally Unusual, Serum Protein. *Front Immunol*. 2018;9:764.

268. Kishore U, Reid KB. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*. 2000;49(1-2):159-70.
269. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, et al. Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: insights into mitochondrial-nuclear interactions. *Hum Mol Genet*. 2014;23(13):3537-51.
270. Cortes-Pereira E, Fernandez-Tajes J, Fernandez-Moreno M, Vazquez-Mosquera ME, Relano S, Ramos-Louro P, et al. Differential Association of Mitochondrial DNA Haplogroups J and H With the Methylation Status of Articular Cartilage: Potential Role in Apoptosis and Metabolic and Developmental Processes. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(7):1191-200.
271. Jones SF, Infante JR. Molecular Pathways: Fatty Acid Synthase. *Clin Cancer Res*. 2015;21(24):5434-8.
272. Van Vranken JG, Nowinski SM, Clowers KJ, Jeong MY, Ouyang Y, Berg JA, et al. ACP Acylation Is an Acetyl-CoA-Dependent Modification Required for Electron Transport Chain Assembly. *Mol Cell*. 2018;71(4):567-80.e4.
273. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(11):665-80.
274. Bellizzi D, D'Aquila P, Giordano M, Montesanto A, Passarino G. Global DNA methylation levels are modulated by mitochondrial DNA variants. *Epigenomics*. 2012;4(1):17-27.
275. Boehm AK, Seth M, Mayr KG, Fortier LA. Hsp90 mediates insulin-like growth factor 1 and interleukin-1beta signaling in an age-dependent manner in equine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2007;56(7):2335-43.
276. Penades JR, Donderis J, Garcia-Caballer M, Tormo-Mas MA, Marina A. dUTPases, the unexplored family of signalling molecules. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(2):163-70.

ANEXOS

ANEXO I Consentimiento informado



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARTICIPANTE EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TÍTULO LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES REUMATOLÓGICAS.
IDENTIDAD RESPONSABLE: DR. FRANCISCO JAVIER BLANCO GARCÍA.
SERVICIO MÉDICO / GRUPO DE INVESTIGACIÓN: SERVICIO DE REUMATOLOGÍA.
CENTRO HOSPITALARIO: XERENCIA XESTIÓN INTEGRADA A CORUÑA (XXIAC). – INSTITUTO INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA A CORUÑA (INIBIC)

FINALIDAD DE LA PARTICIPACIÓN.-

Le invitamos a colaborar en la Línea de investigación de de las enfermedades reumatológicas, es decir, patologías reumáticas y/o del aparato locomotor.

Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades una vez empleadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para ser utilizadas en investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Toda investigación biomédica requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar.

El objetivo principal de esta **Línea de investigación** es poder utilizar estas muestras en los distintos proyectos de investigación en los que participe el responsable de la misma, el Dr. Francisco Javier Blanco García y cualquier otro personal adscrito o colaborador del Grupo de Investigación del Servicio de Reumatología del CHUAC - XXIAC y/o del INIBIC; siempre y cuando, dichos estudios se enmarquen en el análisis de las patologías reumatológicas en general, y particularmente enfermedades reumáticas y/o del aparato locomotor.

Debe saber que la realización de los proyectos de investigación en los que se utilicen muestras humanas, será previamente autorizada por el Comité de Ética competente.

La finalidad principal de esta investigación es progresar en el conocimiento de la patología a estudiar y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento, tanto médico como quirúrgico.

Toda la información que le facilitamos en este documento y la actividad del Grupo de investigación y el Biobanco están reguladas por la *Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD)*, la *Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM)*, el *Real Decreto 1716/2011, de 11 de noviembre*.

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. **Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura. Antes de firmar el consentimiento puede preguntarnos cualquier duda que le surja o consultar con terceras personas.**

MUESTRAS BIOLÓGICAS E INFORMACIÓN ASOCIADA. RIESGOS.-

MUESTRAS BIOLÓGICAS (*Sangre, Líquidos Biológicos, Tejidos*) que se le han obtenido durante su atención sanitaria en este centro hospitalario y que ya no es necesario utilizarlas para la finalidad por la que se obtuvieron.

El responsable guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, bajo la responsabilidad del **Dr. Francisco Javier Blanco García**.

Es muy importante subrayar que, para la obtención de las muestras, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional a los que deriven de su adecuada atención médica.

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles y no hayan sido anonimadas.

INFORMACIÓN CLÍNICA que, junto con los resultados de los estudios realizados en las muestras, nos permita extraer conclusiones útiles para el manejo de las enfermedades. Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario

obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será conservada junto a la muestra. *(Más información en el apartado de Confidencialidad.)*

En caso de ser necesaria alguna información o muestra adicional, y siempre que usted nos lo autorice en la hoja de consentimiento, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración.

CONDICIONES DE LA DONACIÓN.-

La donación y utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. Usted renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados o potenciales beneficios económicos que puedan derivarse de las investigaciones que se realicen con la muestra que cede.

Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo para su salud como resultado de su donación. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de los resultados de la investigación corresponderá al investigador y a la Institución donde se realice la investigación.

CONFIDENCIALIDAD.-

Toda la información referida a usted será considerada confidencial y tratada en base a las indicaciones establecidas en la normativa indicada al inicio de este documento. Tal información sólo estará disponible para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**. Sus muestras y sus datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero de datos de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña (XXIAC).

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada, desde su entrada en la investigación, con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el personal autorizado, en una base de datos que cumple todos los requisitos legales exigidos. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos, por si fuera información de interés clínico.

La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores colaboradores con esta investigación, se realizará de manera codificada (se mantendrá por el investigador responsable en este centro el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar con esta línea de investigación de la insuficiencia cardíaca usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones. Usted puede no autorizarnos a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja del consentimiento informado.

Puede ejercitar los **DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO)** que le reconoce la normativa española, dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- **ENTREGA EN PERSONA**, en la Secretaría del Servicio de Reumatología de la XXIAC, a la atención del Dr. Francisco Javier Blanco García.
- **CORREO POSTAL**: Dr. Francisco Javier Blanco García. Consultas Externas Reumatología. Planta 3ª, Hospital Universitario A Coruña. Xerencia Xestión Integrada A Coruña. As Xubias, 84. A Coruña. 15006
- **CORREO ELECTRÓNICO**: Fblagar@sergas.es

Usted puede contactar con el responsable de la Línea de investigación de insuficiencia cardíaca, D. Francisco J. Blanco García si le surge cualquier duda sobre su participación en esta investigación, en el **Teléfono: 981 17 63 99 / 981 17 63 06**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar, de cualquiera de las maneras descritas anteriormente, a la atención del responsable de esta investigación D. Francisco Javier Blanco García, la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento.

Usted debe saber que la revocación tendrá efectos a partir del momento en que se formalice y no afectará a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo hasta ese momento.

RESTRICCIONES DE USO DE LA MUESTRA.-

Usted puede indicarnos si quiere establecer algún tipo de restricción sobre sus muestras y datos, en relación a su posible uso en determinados proyectos de investigación o en cuanto a determinadas cesiones. Para ello dispone de un apartado específico en la hoja de firma del consentimiento informado.

INFORMACIÓN SOBRE RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.-

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

El responsable de la investigación tendrá a disposición de los participantes la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y datos.

En determinadas circunstancias el Comité de Ética competente podrá decidir si es necesario contactar con el participante para facilitarle información de manera individualizada.

Las diferentes investigaciones en las que se utilicen sus muestras y datos pueden requerir la realización de **estudios de biología celular y genéticos**, y a partir de ellos se puede obtener información que puede ser relevante para su salud o la de su familia. En los **estudios genéticos** se puede descubrir información no buscada, lo que se denominan hallazgos inesperados. Cuando esto se produzca, los resultados obtenidos serán validados y analizados por profesionales para determinar si son fiables en un porcentaje óptimo que aconseje su comunicación a las personas afectadas.

Usted debe saber que tiene derecho a conocer, o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.

DESTINO FINAL DE LA MUESTRA

Cuando así lo determine la persona responsable de la Línea de investigación con la que usted accedió a colaborar con sus muestras y datos, y siempre que así lo autorice en la hoja de firma del consentimiento informado, las muestras sobrantes junto a los datos asociados serán depositadas en el Biobanco A Coruña.

Los Biobancos son bancos de almacenamiento de muestras de origen humano para su utilización en investigaciones nacionales o internacionales dentro del campo de la biomedicina. Su funcionamiento se centra en gestionar, bajo criterios de seguridad, calidad y eficiencia; la recepción, procesamiento, almacenamiento y posterior cesión de muestras a los investigadores solicitantes, para que utilicen las mismas en sus proyectos de investigación; siempre y cuando, éstos cumplan todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas.

El Biobanco guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones del (*indicar el Centro del que depende el Biobanco*), bajo la responsabilidad de la Dirección del Biobanco A Coruña.

La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores solicitantes de las muestras, comunitarios (países miembros de la Unión Europea) o extracomunitarios (no miembros), se efectuará con carácter general de manera anónima o disociada, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos, sin que se pueda identificar por medios razonables su identidad. En las investigaciones en las que se considere necesario para el desarrollo de las mismas, a propuesta del investigador responsable y previa autorización del comité de ética competente, podrán enviarse sus muestras codificadas (se mantendrá por el biobanco el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.



El Biobanco A Coruña asume como propio todo lo descrito en los apartados previos de este documento en relación a la confidencialidad, los posibles hallazgos, etc.

El biobanco podrá repercutir únicamente los costes de obtención, procesado y envío de las muestras a los investigadores/instituciones que las solicitaron.

BIOBANCO A CORUÑA

TITULAR DIRECCIÓN CIENTÍFICA: Angel Concha López

TELÉFONO DE CONTACTO: 981 17 64 37. CORREO ELECTRÓNICO: BioBanco.CHUAC@sergas.es

CIERRE DEL BIOBANCO.-

De producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en la página web del Biobanco y/o Centro Hospitalario http://www.inibic.es/inv_apoyo_biobanco.html y en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica del Instituto de Salud Carlos III (ISC III), con página web www.isciii.es, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.

Muchas gracias por su colaboración.



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

Yo,..... (Nombre y apellidos del participante manuscritos) he leído la hoja de información y pude hacer todas las preguntas que consideré necesarias, y acepto participar en la Línea de investigación de enfermedades reumatológicas con mis muestras y datos para que se utilicen en las condiciones que me han informado.

RESTRICCIONES DE USO (usted podrá indicarnos cruzando la correspondiente casilla las restricciones de uso que considere. En caso de no marcar ninguna casilla entenderemos que NO manifiesta ninguna condición de uso).

- NO** autorizo a utilizar mis muestras y datos en investigaciones que
- NO** autorizo a que consulten y obtengan información de mi historia clínica.
- NO** acepto que contacten conmigo cuando sea necesario.
- NO** quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud.
- NO** autorizo la cesión de mis muestras y datos de manera codificada (disociada).
- NO** autorizo la cesión de mis muestras y datos fuera de la Unión Europea.
- NO** autorizo el depósito en el **Biobanco A Coruña** de mis muestras y datos en las condiciones indicadas en la hoja de información

Si acepta que se contacte con usted cuando sea necesario, por favor indique su Teléfono / E-mail de contacto:

.....

Firma del participante

Identidad del participante:

Firma de la persona que informa

Identidad de la persona que informa:

Firma del testigo

Confirmando el consentimiento verbal del participante, el cual lo autoriza a firmar en su nombre

Identidad del testigo: DNI:

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante no pueda leer y/o escribir y delegue la firma en el testigo.

Firma del representante legal

Identidad representante legal: DNI:

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante esté incapacitado legalmente.

En, a de de

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.



REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña: con DNI

Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha:

Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al(nombre del Centro Sanitario), que doy con esta fecha por finalizada.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

Yo, D./Dña: con DNI

En calidad de: (señale la opción aplicable a su caso)

Testigo que firma en lugar

Representante legal

de D./Dña: con DNI,

Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha:

Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al(nombre del Centro Sanitario), que doy con esta fecha por finalizada.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.

SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.

La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.

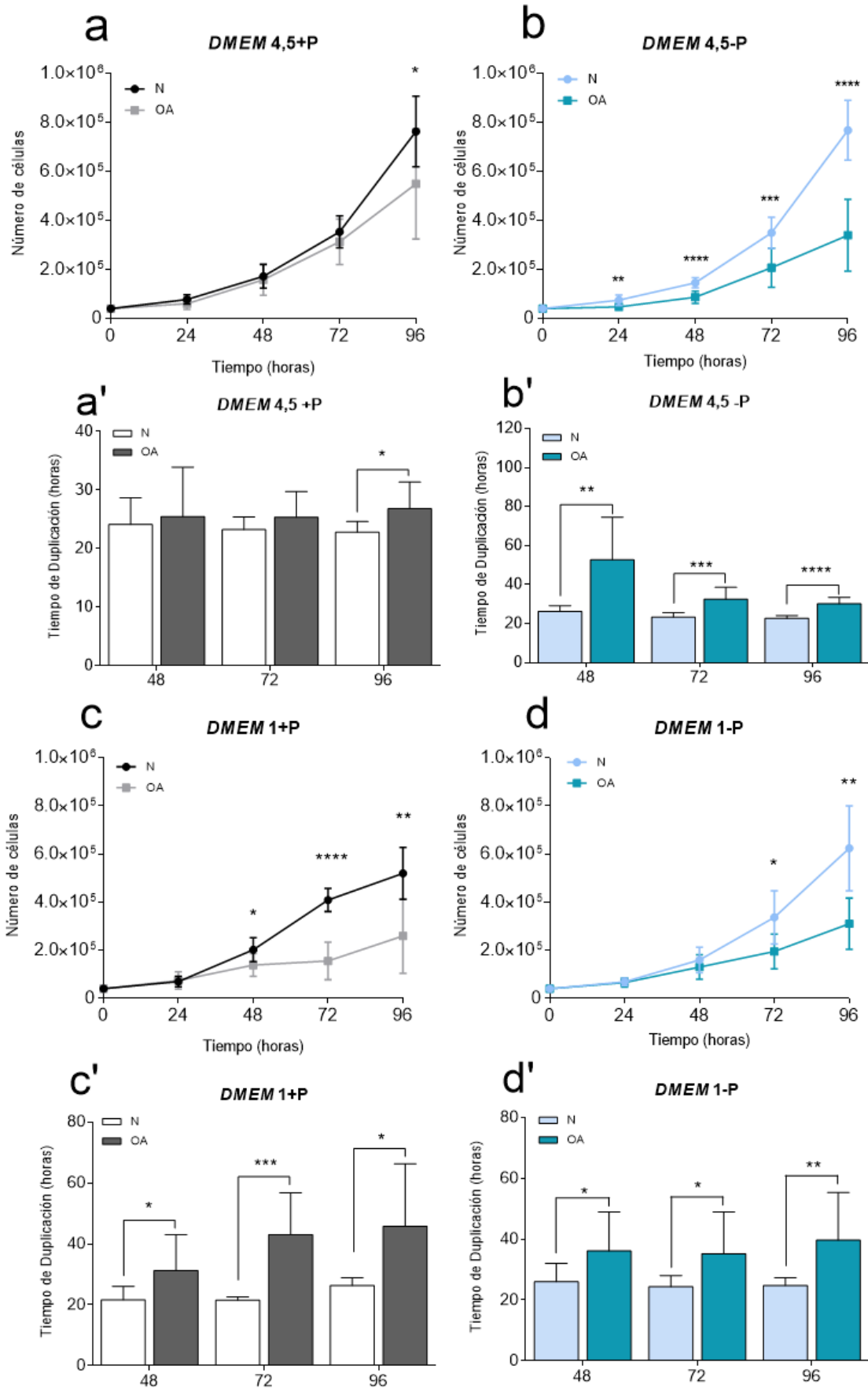
SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

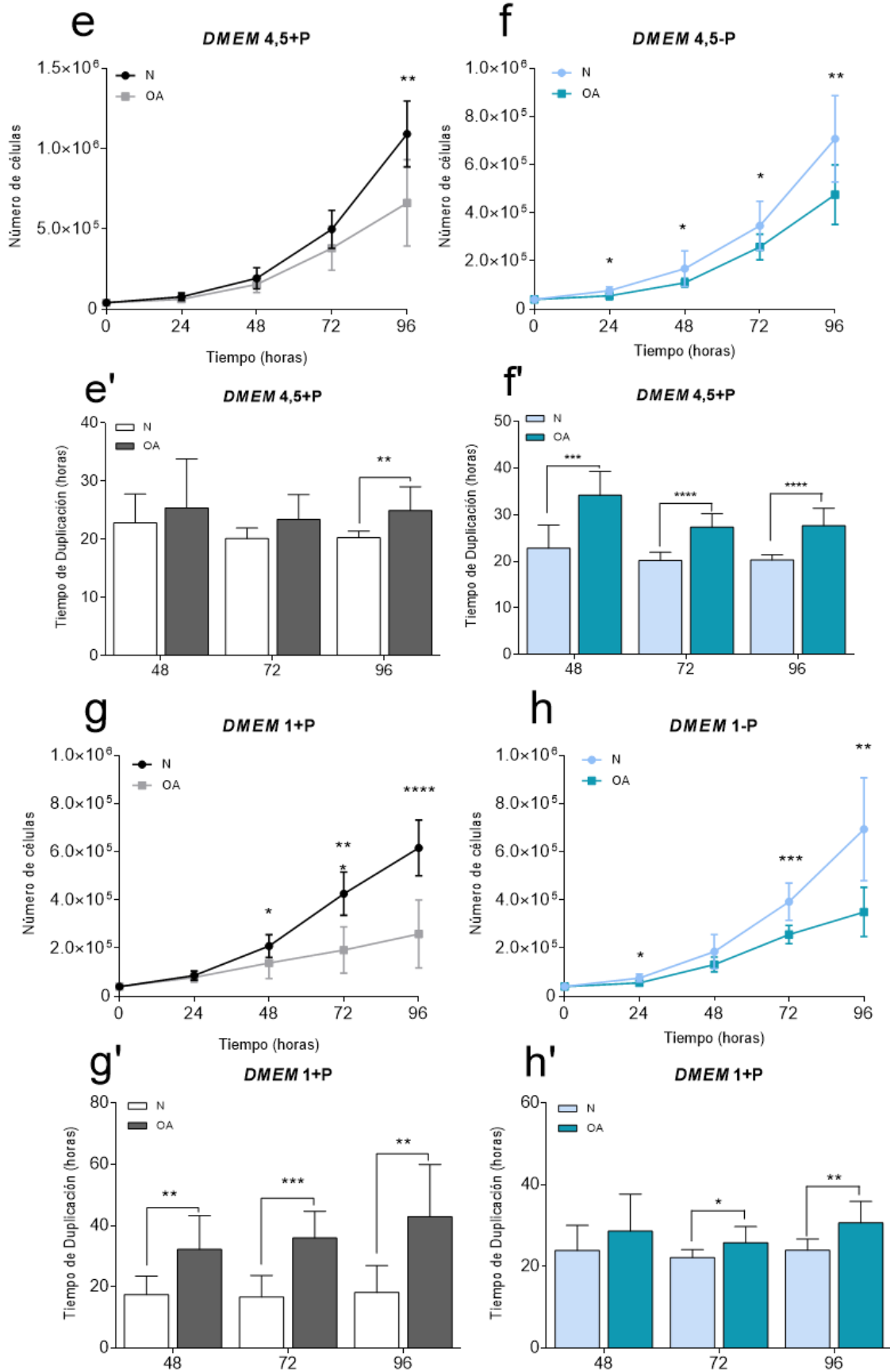
En.....a.....de.....de 20.....

ANEXO II Resultados complementarios

NORMOXIA

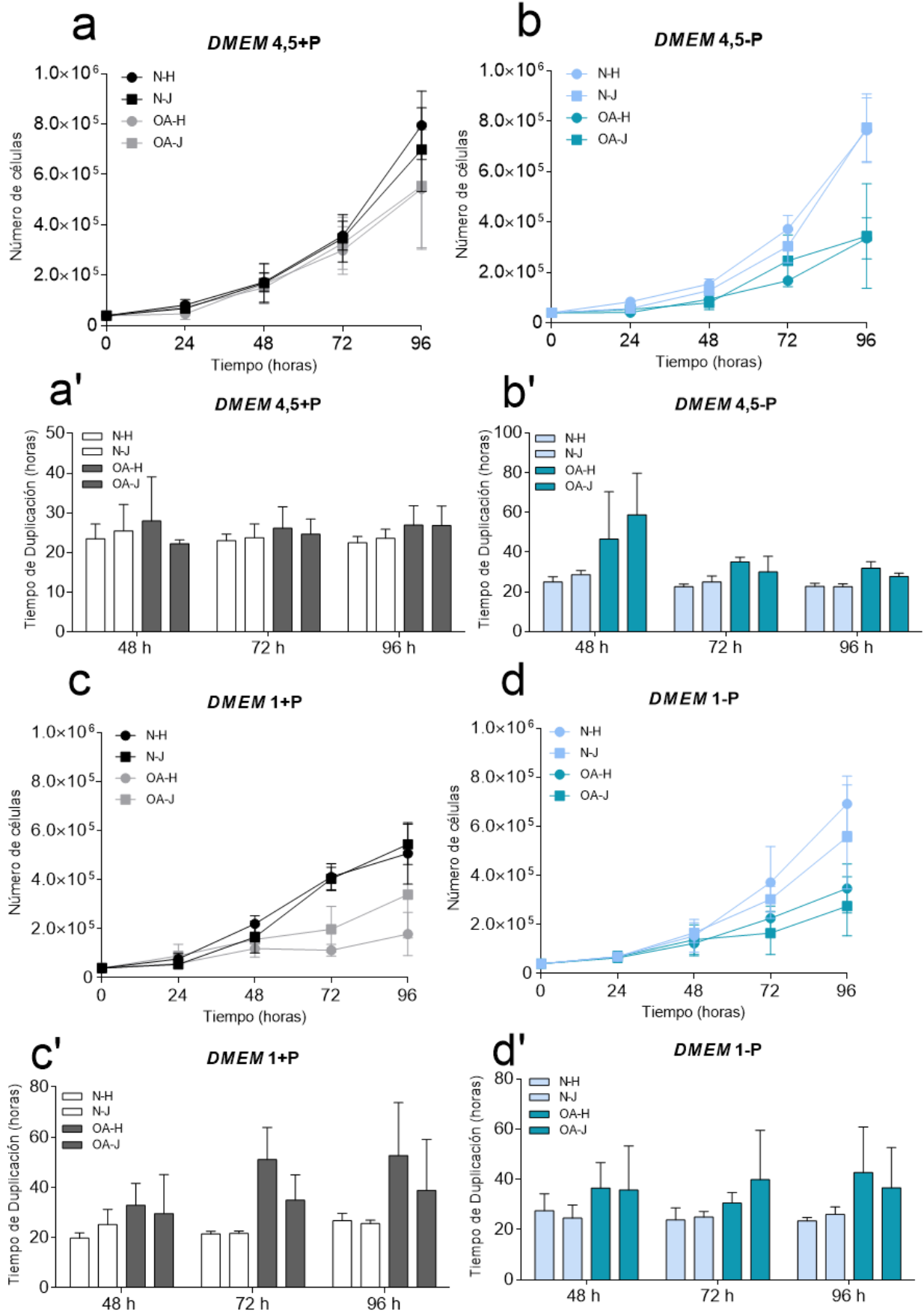


HIPOXIA

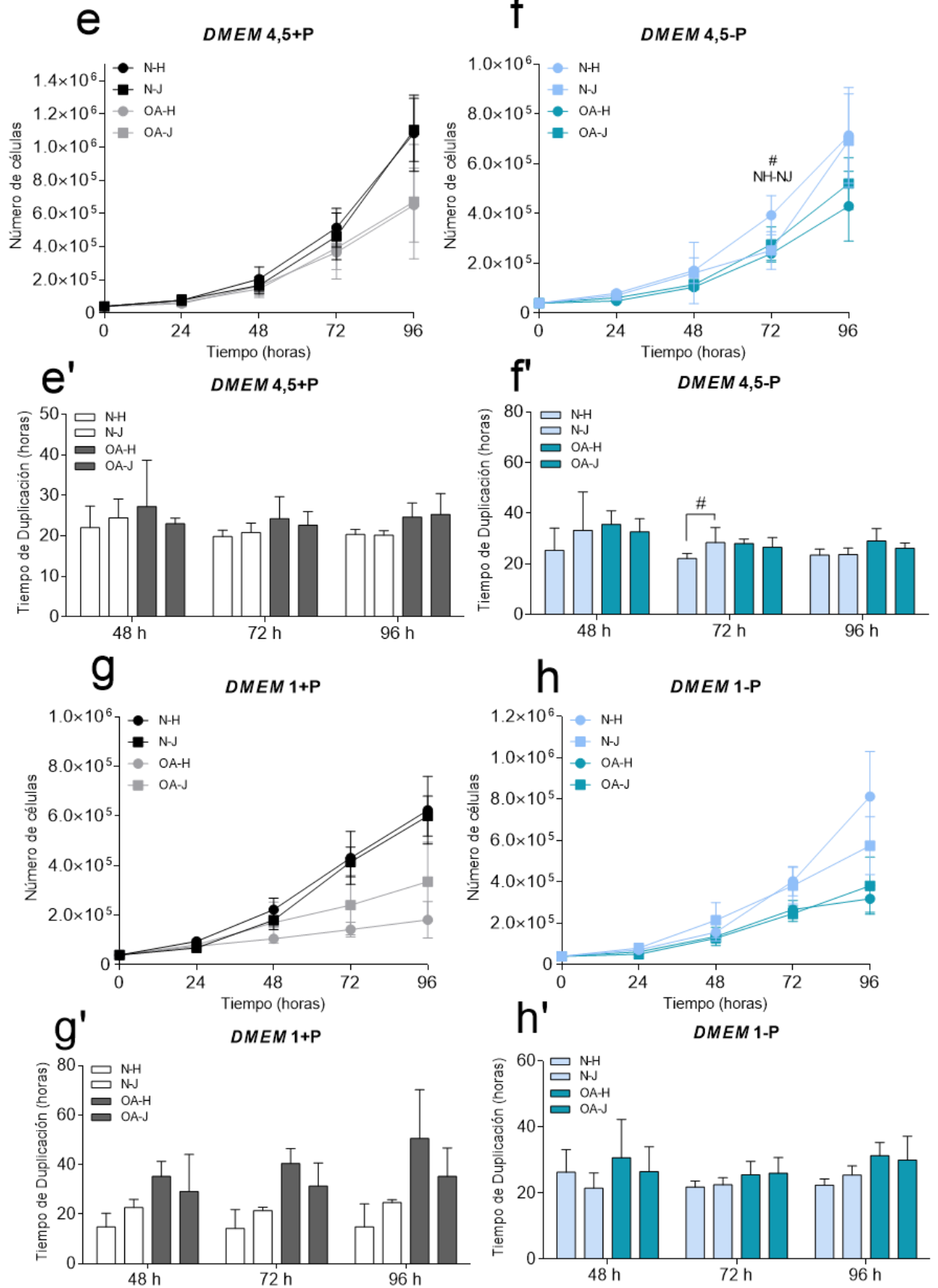


Anexo II- Figura 1 Representación gráfica de la tasa de crecimiento celular (a-d) y del TD (a'-d') durante un periodo de 96h en los híbridos N y OA en condiciones de normoxia y de hipoxia (e-h crecimiento y e'-h' TD). **(a-a' y e-e')** Células en cultivo con *DMEM* 4,5+P. **(b-b' y f-f')** Células en cultivo con *DMEM* 4,5 - P. **(c-c' y g-g')** Células en cultivo con *DMEM* 1 + P. **(d-d' y h-h')** Células en cultivo con *DMEM* 1 - P. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ híbridos N y OA. P: piruvato.

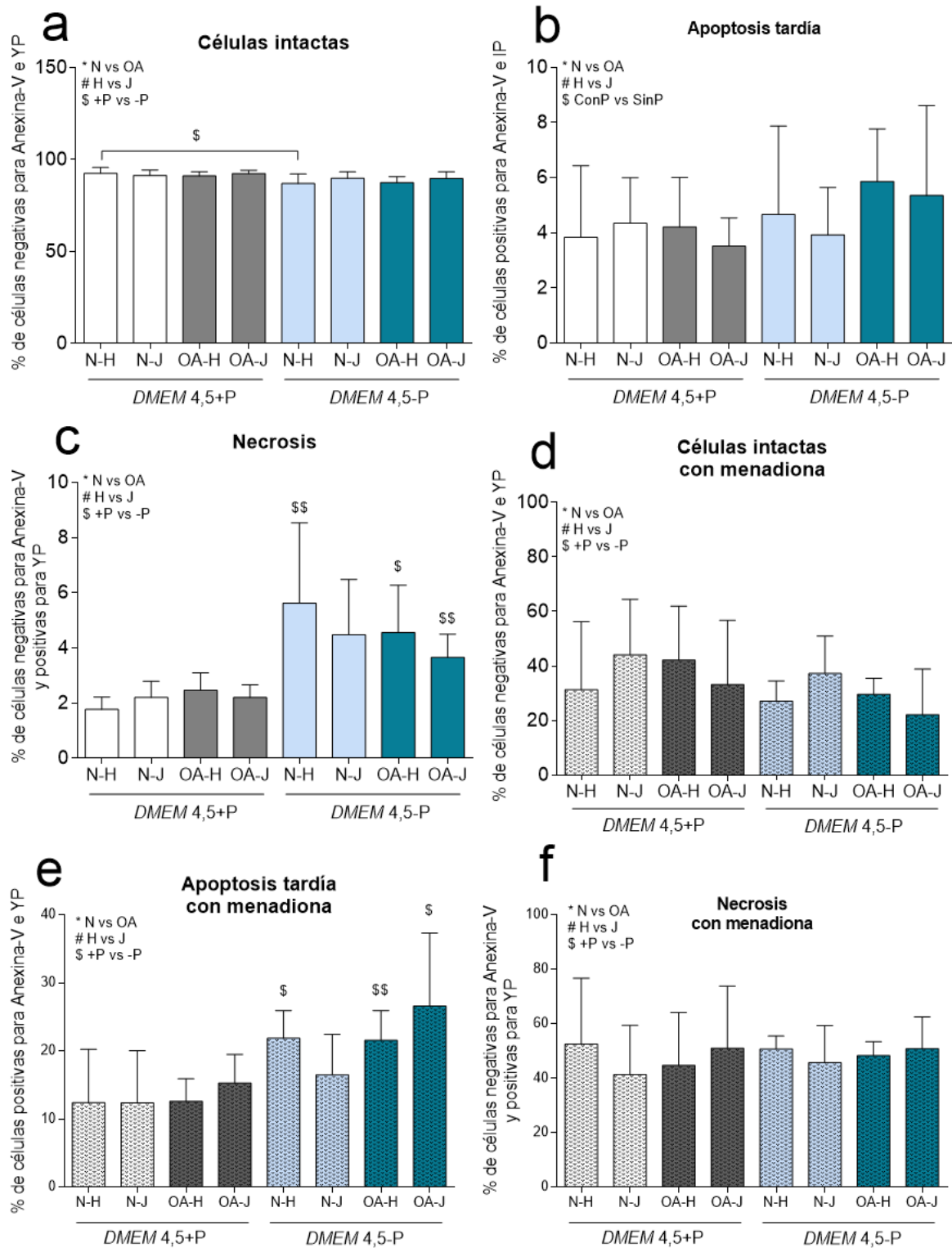
NORMOXIA



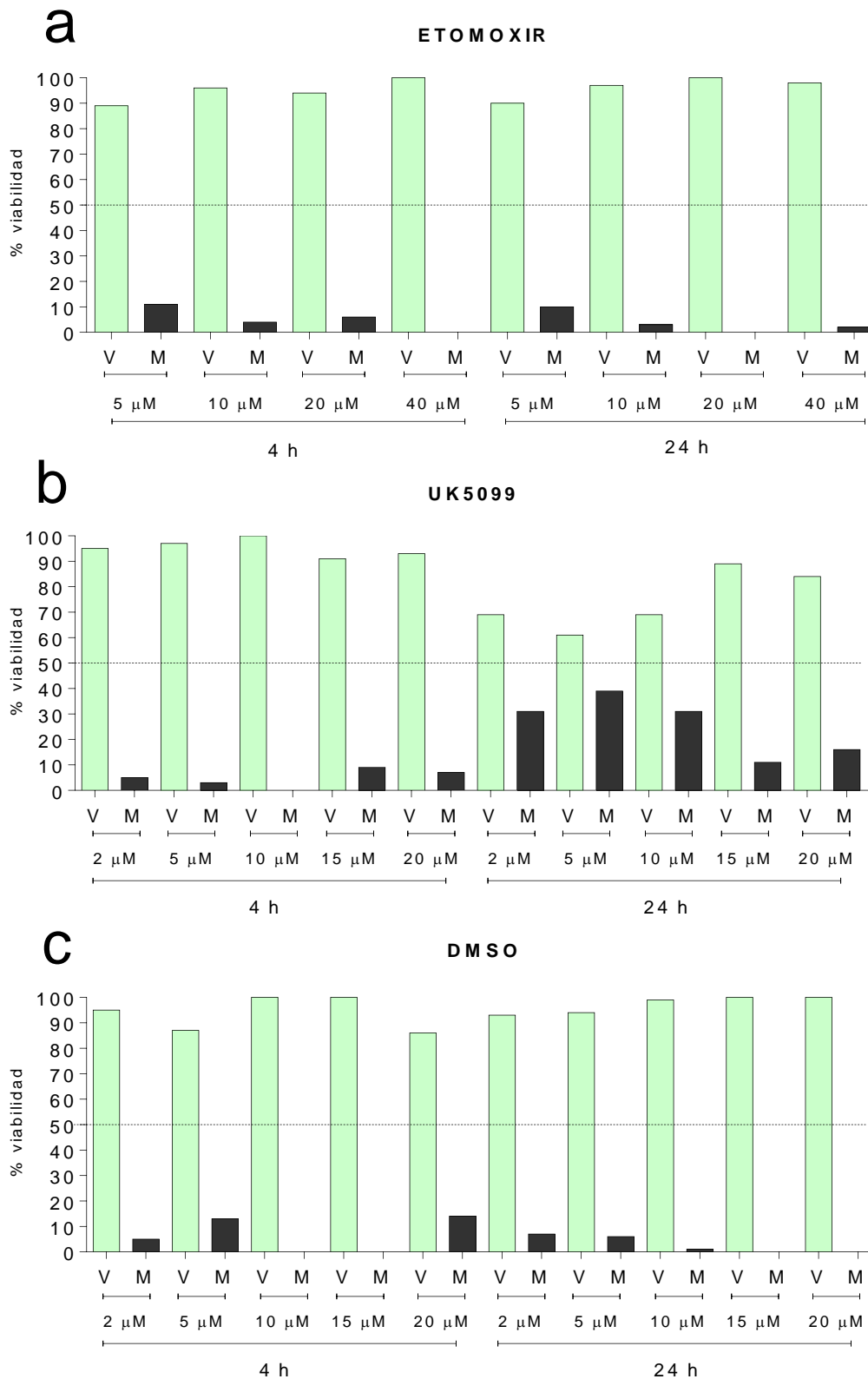
HIPOXIA



Anexo II- Figura 2 Representación gráfica de la tasa de crecimiento celular (a-d) y del TD (a'-d') durante un periodo de 96h en los híbridos N-H, N-J, OA-H y OA-J en condiciones de normoxia y de hipoxia (e-h crecimiento y e'-h' TD). **(a-a' y e-e')** Células en cultivo con *DMEM* 4,5+P. **(b-b' y f-f')** Células en cultivo con *DMEM* 4,5 - P. **(c-c' y g-g')** Células en cultivo con *DMEM* 1+P. **(d-d' y h-h')** Células en cultivo con *DMEM* 1-P. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. # $p \leq 0,05$ haplogrupos de ADNmt H y J.



Anexo II- Figura 3 Porcentaje de células marcadas con Anexina-V e YP en presencia y ausencia de piruvato. **(a-b-c)** % de células intactas, células en apoptosis tardía y células en necrosis en condición basal. **(d-e-f)** % de células intactas, células en apoptosis tardía y células en necrosis en condición basal. Los datos se representan como media \pm DE de tres experimentos independientes. \$ $p \leq 0,05$, \$\$ $p \leq 0,01$ + y - P. # haplogrupos de ADNmt h y J. P: piruvato.



Anexo II- Figura 4 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT en presencia de los inhibidores de transportadores mitocondriales etomoxir (a) y UK5099 (b), y su vehículo, el DMSO (c). Verde: células vivas (V). Negro: células muertas (M). Línea de puntos marca el 50% de viabilidad.

Anexo II- Tabla 1 Total de 601 identificadas con al menos 2 péptidos con un intervalo de confianza del 95% por el software *Protein Pilot* 3.0.

Nº	ACC. Nº	NOMBRE PROTEÍNA	SÍMBOLO GEN	PEP (95%)
1	P11142	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	HSPA8	37
2	P06733	<i>Alpha-enolase</i>	ENO1	30
3	P14618	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	PKM	33
4	P08238	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	HSP90AB1	33
5	P13639	<i>Elongation factor 2</i>	EEF2	26
6	P63261	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	ACTG1	40
7	P08670	<i>Vimentin</i>	VIM	36
8	P10809	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	HSPD1	21
9	P78527	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>	PRKDC	16
10	P19338	<i>Nucleolin</i>	NCL	18
11	P07355	<i>Annexin A2</i>	ANXA2	19
12	Q09666	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK</i>	AHNAK	17
13	P04406	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GAPDH	23
14	P21333	<i>Filamin-A</i>	FLNA	16
15	P68363	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	TUBA1B	26
16	P07437	<i>Tubulin beta chain</i>	TUBB	27
17	P09651	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>	HNRNPA1	21
18	P12814	<i>Alpha-actinin-1</i>	ACTN1	16
19	P62937	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	PPIA	24
20	P11021	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	HSPA5	15
21	O60506	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i>	SYNCRIP	12
22	P60842	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	EIF4A1	13
23	Q5VTE0	<i>Putative elongation factor 1-alpha-like 3</i>	EEF1A1P5	16
24	Q14204	<i>Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1</i>	DYNC1H1	12
25	P31948	<i>Stress-induced-phosphoprotein 1</i>	STIP1	12
26	Q00610	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	CLTC	12

27	P06748	<i>Nucleophosmin</i>	<i>NPM1</i>	31
28	P62805	<i>Histone H4</i>	<i>HIST1H4A</i>	17
29	Q08211	<i>ATP-dependent RNA helicase A</i>	<i>DHX9</i>	14
30	P31939	<i>Bifunctional purine biosynthesis protein PURH</i>	<i>ATIC</i>	11
31	Q15149	<i>Plectin</i>	<i>PLEC</i>	10
32	P22626	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	<i>HNRNPA2 B1</i>	14
33	O00410	<i>Importin-5</i>	<i>IPO5</i>	13
34	P63244	<i>Receptor of activated protein C kinase 1</i>	<i>RACK1</i>	10
35	P07195	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	<i>LDHB</i>	14
36	P07900	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	<i>HSP90AA1</i>	26
37	Q16778	<i>Histone H2B type 2-E</i>	<i>HIST2H2B E</i>	32
38	P27797	<i>Calreticulin</i>	<i>CALR</i>	12
39	P63104	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	<i>YWHAZ</i>	10
40	P23528	<i>Cofilin-1</i>	<i>CFL1</i>	9
41	P14625	<i>Endoplasmin</i>	<i>HSP90B1</i>	11
42	P49327	<i>Fatty acid synthase</i>	<i>FASN</i>	11
43	P30101	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	<i>PDIA3</i>	9
44	P06576	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	<i>ATP5B</i>	11
45	P48643	<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	<i>CCT5</i>	10
46	P60174	<i>Triosephosphate isomerase</i>	<i>TPI1</i>	10
47	P18206	<i>Vinculin</i>	<i>VCL</i>	9
48	P78371	<i>T-complex protein 1 subunit beta</i>	<i>CCT2</i>	10
49	P07737	<i>Profilin-1</i>	<i>PFN1</i>	14
50	Q92945	<i>Far upstream element-binding protein 2</i>	<i>KHSRP</i>	10
51	P27824	<i>Calnexin</i>	<i>CANX</i>	8
52	P40926	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	<i>MDH2</i>	9
53	P17844	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5</i>	<i>DDX5</i>	8
54	P08133	<i>Annexin A6</i>	<i>ANXA6</i>	8
55	P61604	<i>10 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	<i>HSPE1</i>	9

56	O75643	<i>U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase</i>	SNRNP200	8
57	P04075	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	ALDOA	9
58	P62191	<i>26S protease regulatory subunit 4</i>	PSMC1	8
59	P35579	<i>Myosin-9</i>	MYH9	7
60	P61978	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>	HNRNPK	8
61	P62701	<i>40S ribosomal protein S4, X isoform</i>	RPS4X	8
62	P26038	<i>Moesin</i>	MSN	7
63	P26599	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>	PTBP1	8
64	Q15233	<i>Non-POU domain-containing octamer-binding protein</i>	NONO	9
65	P00558	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	PGK1	10
66	P16402	<i>Histone H1.3</i>	HIST1H1D	8
67	Q99878	<i>Histone H2A type 1-J</i>	HIST1H2A J	9
68	P38646	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	HSPA9	10
69	P05141	<i>ADP/ATP translocase 2</i>	SLC25A5	7
70	Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>	PRDX1	8
71	P52597	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F</i>	HNRNPF	8
72	P04083	<i>Annexin A1</i>	ANXA1	7
73	P63241	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1</i>	EIF5A	12
74	P09382	<i>Galectin-1</i>	LGALS1	8
75	Q9BUF5	<i>Tubulin beta-6 chain</i>	TUBB6	16
76	Q99623	<i>Prohibitin-2</i>	PHB2	7
77	P08865	<i>40S ribosomal protein SA</i>	RPSA	8
78	P09429	<i>High mobility group protein B1</i>	HMGB1	10
79	P62269	<i>40S ribosomal protein S18</i>	RPS18	8
80	P23246	<i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i>	SFPQ	6
81	P50990	<i>T-complex protein 1 subunit theta</i>	CCT8	6
82	P47897	<i>Glutamine--tRNA ligase</i>	QARS	7
83	Q15365	<i>Poly(rC)-binding protein 1</i>	PCBP1	6

84	P43243	<i>Matrin-3</i>	<i>MATR3</i>	6
85	Q13838	<i>Spliceosome RNA helicase DDX39B</i>	<i>DDX39B</i>	7
86	P08758	<i>Annexin A5</i>	<i>ANXA5</i>	7
87	P55209	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 1</i>	<i>NAP1L1</i>	9
88	P49368	<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>	<i>CCT3</i>	8
89	P46013	<i>Proliferation marker protein Ki-67</i>	<i>MKI67</i>	6
90	Q9NR30	<i>Nucleolar RNA helicase 2</i>	<i>DDX21</i>	6
91	P02786	<i>Transferrin receptor protein 1</i>	<i>TFRC</i>	6
92	P37802	<i>Transgelin-2</i>	<i>TAGLN2</i>	10
93	P06744	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	<i>GPI</i>	9
94	P42704	<i>Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial</i>	<i>LRPPRC</i>	6
95	P33992	<i>DNA replication licensing factor MCM5</i>	<i>MCM5</i>	5
96	P84103	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 3</i>	<i>SRSF3</i>	7
97	P24534	<i>Elongation factor 1-beta</i>	<i>EEF1B2</i>	6
98	Q00839	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>	<i>HNRNPU</i>	9
99	P11940	<i>Polyadenylate-binding protein 1</i>	<i>PABPC1</i>	6
100	P52272	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>	<i>HNRNPM</i>	6
101	P33991	<i>DNA replication licensing factor MCM4</i>	<i>MCM4</i>	6
102	Q14315	<i>Filamin-C</i>	<i>FLNC</i>	7
103	Q01082	<i>Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1</i>	<i>SPTBN1</i>	6
104	Q04760	<i>Lactoylglutathione lyase</i>	<i>GLO1</i>	6
105	P34897	<i>Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial</i>	<i>SHMT2</i>	6
106	P35659	<i>Protein DEK</i>	<i>DEK</i>	6
107	Q99729	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B</i>	<i>HNRNPAB</i>	6
108	P22392	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	<i>NME2</i>	5
109	Q01469	<i>Fatty acid-binding protein, epidermal</i>	<i>FABP5</i>	7
110	P25705	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	<i>ATP5A1</i>	6
111	P55072	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	<i>VCP</i>	5
112	O00571	<i>ATP-dependent RNA helicase DDX3X</i>	<i>DDX3X</i>	6

113	Q13813	<i>Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1</i>	<i>SPTAN1</i>	5
114	P12956	<i>X-ray repair cross-complementing protein 6</i>	<i>XRCC6</i>	6
115	P33316	<i>Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial</i>	<i>DUT</i>	7
116	P36578	<i>60S ribosomal protein L4</i>	<i>RPL4</i>	6
117	P05023	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</i>	<i>ATP1A1</i>	6
118	P23396	<i>40S ribosomal protein S3</i>	<i>RPS3</i>	5
119	P26641	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	<i>EEF1G</i>	7
120	P40429	<i>60S ribosomal protein L13a</i>	<i>RPL13A</i>	5
121	P18669	<i>Phosphoglycerate mutase 1</i>	<i>PGAM1</i>	5
122	P27635	<i>60S ribosomal protein L10</i>	<i>RPL10</i>	5
123	Q7KZF4	<i>Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1</i>	<i>SND1</i>	6
124	P00338	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	<i>LDHA</i>	6
125	O00299	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	<i>CLIC1</i>	5
126	P40227	<i>T-complex protein 1 subunit zeta</i>	<i>CCT6A</i>	5
127	P37108	<i>Signal recognition particle 14 kDa protein</i>	<i>SRP14</i>	5
128	P10599	<i>Thioredoxin</i>	<i>TXN</i>	5
129	P35637	<i>RNA-binding protein FUS</i>	<i>FUS</i>	5
130	P15880	<i>40S ribosomal protein S2</i>	<i>RPS2</i>	5
131	Q13435	<i>Splicing factor 3B subunit 2</i>	<i>SF3B2</i>	6
132	Q07021	<i>Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial</i>	<i>C1QBP</i>	6
133	P26640	<i>Valine--tRNA ligase</i>	<i>VAR5</i>	5
134	P62244	<i>40S ribosomal protein S15a</i>	<i>RPS15A</i>	4
135	P09936	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1</i>	<i>UCHL1</i>	6
136	P07237	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	<i>P4HB</i>	5
137	Q13200	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2</i>	<i>PSMD2</i>	4
138	P61247	<i>40S ribosomal protein S3a</i>	<i>RPS3A</i>	7
139	P67936	<i>Tropomyosin alpha-4 chain</i>	<i>TPM4</i>	5

140	P34932	<i>Heat shock 70 kDa protein 4</i>	<i>HSPA4</i>	5
141	P62979	<i>Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a</i>	<i>RPS27A</i>	4
142	Q86V81	<i>THO complex subunit 4</i>	<i>ALYREF</i>	5
143	P62277	<i>40S ribosomal protein S13</i>	<i>RPS13</i>	5
144	Q96AE4	<i>Far upstream element-binding protein 1</i>	<i>FUBP1</i>	6
145	P22234	<i>Multifunctional protein ADE2</i>	<i>PAICS</i>	4
146	Q16658	<i>Fascin</i>	<i>FSCN1</i>	4
147	Q9NZM1	<i>Myoferlin</i>	<i>MYOF</i>	5
148	P35232	<i>Prohibitin</i>	<i>PHB</i>	4
149	P29692	<i>Elongation factor 1-delta</i>	<i>EEF1D</i>	4
150	P39687	<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A</i>	<i>ANP32A</i>	6
151	Q71DI3	<i>Histone H3.2</i>	<i>HIST2H3A</i>	6
152	P50395	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>	<i>GDI2</i>	5
153	Q14839	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4</i>	<i>CHD4</i>	4
154	P54819	<i>Adenylate kinase 2, mitochondrial</i>	<i>AK2</i>	4
155	Q14697	<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>	<i>GANAB</i>	4
156	P20700	<i>Lamin-B1</i>	<i>LMNB1</i>	4
157	P22314	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	<i>UBA1</i>	5
158	P62136	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit</i>	<i>PPP1CA</i>	4
159	P09211	<i>Glutathione S-transferase P</i>	<i>GSTP1</i>	7
160	P54727	<i>UV excision repair protein RAD23 homolog B</i>	<i>RAD23B</i>	4
161	P23284	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	<i>PPIB</i>	6
162	Q99497	<i>Protein deglycase DJ-1</i>	<i>PARK7</i>	5
163	P62158	<i>Calmodulin</i>	<i>CALM1</i>	4
164	P67775	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform</i>	<i>PPP2CA</i>	5
165	Q9NY33	<i>Dipeptidyl peptidase 3</i>	<i>DPP3</i>	4
166	P13010	<i>X-ray repair cross-complementing protein 5</i>	<i>XRCC5</i>	4
167	P62081	<i>40S ribosomal protein S7</i>	<i>RPS7</i>	4

168	Q9Y4W6	<i>AFG3-like protein 2</i>	<i>AFG3L2</i>	4
169	O43852	<i>Calumenin</i>	<i>CALU</i>	4
170	Q14157	<i>Ubiquitin-associated protein 2-like</i>	<i>UBAP2L</i>	4
171	P62826	<i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>	<i>RAN</i>	4
172	Q9Y224	<i>UPF0568 protein C14orf166</i>	<i>C14orf166</i>	4
173	P05455	<i>Lupus La protein</i>	<i>SSB</i>	5
174	P60660	<i>Myosin light polypeptide 6</i>	<i>MYL6</i>	4
175	Q9UMX0	<i>Ubiquilin-1</i>	<i>UBQLN1</i>	5
176	P35998	<i>26S protease regulatory subunit 7</i>	<i>PSMC2</i>	4
177	P53618	<i>Coatomer subunit beta</i>	<i>COPB1</i>	4
178	Q04637	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1</i>	<i>EIF4G1</i>	4
179	P40939	<i>Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial</i>	<i>HADHA</i>	4
180	P52292	<i>Importin subunit alpha-1</i>	<i>KPNA2</i>	4
181	P30040	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 29</i>	<i>ERP29</i>	4
182	O43242	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3</i>	<i>PSMD3</i>	4
183	Q07955	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 1</i>	<i>SRSF1</i>	4
184	Q12905	<i>Interleukin enhancer-binding factor 2</i>	<i>ILF2</i>	4
185	P07741	<i>Adenine phosphoribosyltransferase</i>	<i>APRT</i>	4
186	Q01518	<i>Adenylyl cyclase-associated protein 1</i>	<i>CAP1</i>	4
187	Q9Y266	<i>Nuclear migration protein nudC</i>	<i>NUDC</i>	4
188	Q16643	<i>Drebrin</i>	<i>DBN1</i>	4
189	P14174	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>	<i>MIF</i>	13
190	Q16204	<i>Coiled-coil domain-containing protein 6</i>	<i>CCDC6</i>	4
191	P49736	<i>DNA replication licensing factor MCM2</i>	<i>MCM2</i>	4
192	Q9UQE7	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 3</i>	<i>SMC3</i>	4
193	P04632	<i>Calpain small subunit 1</i>	<i>CAPNS1</i>	4
194	Q15637	<i>Splicing factor 1</i>	<i>SF1</i>	4
195	P78344	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2</i>	<i>EIF4G2</i>	4

196	P19367	<i>Hexokinase-1</i>	<i>HK1</i>	4
197	P14314	<i>Glucosidase 2 subunit beta</i>	<i>PRKCSH</i>	3
198	Q14974	<i>Importin subunit beta-1</i>	<i>KPNB1</i>	4
199	P39023	<i>60S ribosomal protein L3</i>	<i>RPL3</i>	4
200	P07910	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2</i>	<i>HNRNPC</i>	5
201	Q14103	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0</i>	<i>HNRNPD</i>	5
202	P35221	<i>Catenin alpha-1</i>	<i>CTNNA1</i>	4
203	O43175	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>	<i>PHGDH</i>	4
204	P30041	<i>Peroxiredoxin-6</i>	<i>PRDX6</i>	5
205	P05388	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>	<i>RPLP0</i>	3
206	P50991	<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>	<i>CCT4</i>	4
207	Q92598	<i>Heat shock protein 105 kDa</i>	<i>HSPH1</i>	5
208	P00441	<i>Superoxide dismutase (Cu - Zn)</i>	<i>SOD1</i>	4
209	P19105	<i>Myosin regulatory light chain 12A</i>	<i>MYL12A</i>	4
210	Q9Y4L1	<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>	<i>HYOU1</i>	4
211	Q13310	<i>Polyadenylate-binding protein 4</i>	<i>PABPC4</i>	6
212	Q9H0U4	<i>Ras-related protein Rab-1B</i>	<i>RAB1B</i>	4
213	Q13185	<i>Chromobox protein homolog 3</i>	<i>CBX3</i>	4
214	O75475	<i>PC4 and SFRS1-interacting protein</i>	<i>PSIP1</i>	4
215	P54136	<i>Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	<i>RARS</i>	5
216	Q9P1F3	<i>Costars family protein ABRACL</i>	<i>ABRACL</i>	4
217	P62258	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	<i>YWHAE</i>	8
218	E9PAV3	<i>Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form</i>	<i>NACA</i>	4
219	P45974	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5</i>	<i>USP5</i>	4
220	Q99832	<i>T-complex protein 1 subunit eta</i>	<i>CCT7</i>	3
221	Q99829	<i>Copine-1</i>	<i>CPNE1</i>	3
222	Q96C19	<i>EF-hand domain-containing protein D2</i>	<i>EFHD2</i>	5
223	Q15056	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4H</i>	<i>EIF4H</i>	3
224	P61204	<i>ADP-ribosylation factor 3</i>	<i>ARF3</i>	3

225	O76003	<i>Glutaredoxin-3</i>	GLRX3	4
226	Q15084	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>	PDIA6	4
227	Q8WYA6	<i>Beta-catenin-like protein 1</i>	CTNNBL1	4
228	P18124	<i>60S ribosomal protein L7</i>	RPL7	4
229	P30153	<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform</i>	PPP2R1A	3
230	Q9UPN3	<i>Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5</i>	MACF1	3
231	Q13283	<i>Ras GTPase-activating protein-binding protein 1</i>	G3BP1	4
232	P26373	<i>60S ribosomal protein L13</i>	RPL13	6
233	P12268	<i>Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2</i>	IMPDH2	3
234	O75369	<i>Filamin-B</i>	FLNB	5
235	Q16629	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 7</i>	SRSF7	5
236	Q9P2J5	<i>Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	LARS	3
237	O14980	<i>Exportin-1</i>	XPO1	3
238	Q07020	<i>60S ribosomal protein L18</i>	RPL18	3
239	P29401	<i>Transketolase</i>	TKT	4
240	Q15029	<i>116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component</i>	EFTUD2	4
241	P09874	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>	PARP1	3
242	P54578	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14</i>	USP14	3
243	Q9UQ35	<i>Serine/arginine repetitive matrix protein 2</i>	SRRM2	3
244	P53999	<i>Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15</i>	SUB1	3
245	P46940	<i>Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1</i>	IQGAP1	3
246	P30086	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	PEBP1	3
247	Q14152	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A</i>	EIF3A	4
248	P51991	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3</i>	HNRNPA3	7
249	P40925	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	MDH1	3
250	P04843	<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1</i>	RPN1	3
251	P33993	<i>DNA replication licensing factor MCM7</i>	MCM7	4

252	Q02878	60S ribosomal protein L6	RPL6	3
253	P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	3
254	Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	3
255	P05387	60S acidic ribosomal protein P2	RPLP2	5
256	Q02952	A-kinase anchor protein 12	AKAP12	5
257	O43143	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	DHX15	3
258	Q16222	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	UAP1	3
259	Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	UBR4	3
260	P41250	Glycine--tRNA ligase	GARS	3
261	O76021	Ribosomal L1 domain-containing protein 1	RSL1D1	3
262	P33176	Kinesin-1 heavy chain	KIF5B	3
263	P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	MTHFD1	3
264	Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	TXNDC5	3
265	P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	27
266	P31946	14-3-3 protein beta/alpha	YWHAB	6
267	Q15366	Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	5
268	Q99613	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	EIF3C	3
269	P14678	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	SNRPB	3
270	O75367	Core histone macro-H2A.1	H2AFY	3
271	P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	PYGB	3
272	P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	PRKAR2A	4
273	Q9NTK5	Obg-like ATPase 1	OLA1	3
274	P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1	DNAJA1	3
275	Q9UHX1	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	PUF60	3
276	P35268	60S ribosomal protein L22	RPL22	3
277	P41252	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	3
278	Q15019	Septin-2	02-sep	3
279	P42166	Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha	TMPO	4

280	P61158	<i>Actin-related protein 3</i>	ACTR3	3
281	Q16543	<i>Hsp90 co-chaperone Cdc37</i>	CDC37	3
282	P22307	<i>Non-specific lipid-transfer protein</i>	SCP2	3
283	P05198	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1</i>	EIF2S1	3
284	O15145	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 3</i>	ARPC3	3
285	Q01813	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type</i>	PFKP	3
286	O75083	<i>WD repeat-containing protein 1</i>	WDR1	3
287	Q99733	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 4</i>	NAP1L4	3
288	P39656	<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit</i>	DDOST	3
289	P62333	<i>26S protease regulatory subunit 10B</i>	PSMC6	3
290	Q9Y5S9	<i>RNA-binding protein 8A</i>	RBM8A	3
291	P25398	<i>40S ribosomal protein S12</i>	RPS12	3
292	Q15717	<i>ELAV-like protein 1</i>	ELAVL1	3
293	Q12765	<i>Secernin-1</i>	SCRN1	3
294	Q8TAE8	<i>Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1</i>	GADD45GIP1	3
295	P23193	<i>Transcription elongation factor A protein 1</i>	TCEA1	3
296	Q92879	<i>CUGBP Elav-like family member 1</i>	CELF1	3
297	O15260	<i>Surfeit locus protein 4</i>	SURF4	4
298	Q9NX55	<i>Huntingtin-interacting protein K</i>	HYPK	3
299	P14854	<i>Cytochrome c oxidase subunit 6B1</i>	COX6B1	5
300	O60220	<i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A</i>	TIMM8A	3
301	P55010	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5</i>	EIF5	3
302	P83731	<i>60S ribosomal protein L24</i>	RPL24	4
303	Q15424	<i>Scaffold attachment factor B1</i>	SAFB	3
304	P62995	<i>Transformer-2 protein homolog beta</i>	TRA2B	3
305	P31930	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial</i>	UQCRC1	3
306	Q13148	<i>TAR DNA-binding protein 43</i>	TARDBP	3

307	P12270	Nucleoprotein TPR	TPR	3
308	P08243	Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	ASNS	3
309	Q9NYL9	Tropomodulin-3	TMOD3	4
310	Q14847	LIM and SH3 domain protein 1	LASP1	3
311	P61289	Proteasome activator complex subunit 3	PSME3	3
312	P49321	Nuclear autoantigenic sperm protein	NASP	3
313	Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	ASPH	3
314	P27708	CAD protein	CAD	3
315	P16070	CD44 antigen	CD44	4
316	P02768	Serum albumin	ALB	4
317	Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	DDX46	3
318	P16401	Histone H1.5	HIST1H1B	5
319	Q15181	Inorganic pyrophosphatase	PPA1	3
320	Q96HC4	PDZ and LIM domain protein 5	PDLIM5	3
321	P17655	Calpain-2 catalytic subunit	CAPN2	3
322	P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNPH1	6
323	O14776	Transcription elongation regulator 1	TCERG1	3
324	P51858	Hepatoma-derived growth factor	HDGF	4
325	P46781	40S ribosomal protein S9	RPS9	3
326	Q9BTT0	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ANP32E	3
327	Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	PRPF8	3
328	Q92616	eIF-2-alpha kinase activator GCN1	GCN1	4
329	P20645	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6PR	3
330	P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12	3
331	P51149	Ras-related protein Rab-7a	RAB7A	3
332	Q14019	Coactosin-like protein	COTL1	4
333	P62266	40S ribosomal protein S23	RPS23	3
334	P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	3

335	P38606	<i>V-type proton ATPase catalytic subunit A</i>	ATP6V1A	3
336	P84090	<i>Enhancer of rudimentary homolog</i>	ERH	3
337	P08621	<i>U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa</i>	SNRNP70	3
338	P62241	<i>40S ribosomal protein S8</i>	RPS8	2
339	O14561	<i>Acyl carrier protein, mitochondrial</i>	NDUFAB1	2
340	P63220	<i>40S ribosomal protein S21</i>	RPS21	3
341	Q13242	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 9</i>	SRSF9	2
342	O75531	<i>Barrier-to-autointegration factor</i>	BANF1	3
343	P09012	<i>U1 small nuclear ribonucleoprotein A</i>	SNRPA	2
344	P50914	<i>60S ribosomal protein L14</i>	RPL14	3
345	Q9Y678	<i>Coatomer subunit gamma-1</i>	COPG1	2
346	O60664	<i>Perilipin-3</i>	PLIN3	3
347	O75400	<i>Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A</i>	PRPF40A	3
348	P18077	<i>60S ribosomal protein L35a</i>	RPL35A	3
349	Q96CS3	<i>FAS-associated factor 2</i>	FAF2	3
350	O95373	<i>Importin-7</i>	IPO7	2
351	O43776	<i>Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	NARS	2
352	Q12906	<i>Interleukin enhancer-binding factor 3</i>	ILF3	2
353	P62841	<i>40S ribosomal protein S15</i>	RPS15	2
354	P49411	<i>Elongation factor Tu, mitochondrial</i>	TUFM	2
355	P12277	<i>Creatine kinase B-type</i>	CKB	2
356	P62753	<i>40S ribosomal protein S6</i>	RPS6	3
357	P04818	<i>Thymidylate synthase</i>	TYMS	2
358	Q9UHB9	<i>Signal recognition particle subunit SRP68</i>	SRP68	3
359	Q8NC51	<i>Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein</i>	SERBP1	2
360	P36957	<i>Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	DLST	2
361	Q13263	<i>Transcription intermediary factor 1-beta</i>	TRIM28	2

362	P60953	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>	<i>CDC42</i>	2
363	P46782	<i>40S ribosomal protein S5</i>	<i>RPS5</i>	5
364	P06753	<i>Tropomyosin alpha-3 chain</i>	<i>TPM3</i>	4
365	O00560	<i>Syntenin-1</i>	<i>SDCBP</i>	2
366	A8MWD9	<i>Putative small nuclear ribonucleoprotein G-like protein 15</i>	<i>SNRPGP15</i>	2
367	P22102	<i>Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3</i>	<i>GART</i>	2
368	Q9Y3I0	<i>tRNA-splicing ligase RtcB homolog</i>	<i>RTCB</i>	2
369	Q8WXX5	<i>DnaJ homolog subfamily C member 9</i>	<i>DNAJC9</i>	2
370	P61088	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N</i>	<i>UBE2N</i>	2
371	Q9H223	<i>EH domain-containing protein 4</i>	<i>EHD4</i>	2
372	Q5SW79	<i>Centrosomal protein of 170 kDa</i>	<i>CEP170</i>	2
373	Q9BVP2	<i>Guanine nucleotide-binding protein-like 3</i>	<i>GNL3</i>	2
374	P33240	<i>Cleavage stimulation factor subunit 2</i>	<i>CSTF2</i>	2
375	P26639	<i>Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	<i>TARS</i>	2
376	P11177	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial</i>	<i>PDHB</i>	2
377	P43686	<i>26S protease regulatory subunit 6B</i>	<i>PSMC4</i>	2
378	P47813	<i>Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal</i>	<i>EIF1AX</i>	2
379	P61353	<i>60S ribosomal protein L27</i>	<i>RPL27</i>	2
380	Q14498	<i>RNA-binding protein 39</i>	<i>RBM39</i>	2
381	P99999	<i>Cytochrome c</i>	<i>CYCS</i>	2
382	P04792	<i>Heat shock protein beta-1</i>	<i>HSPB1</i>	2
383	P62847	<i>40S ribosomal protein S24</i>	<i>RPS24</i>	2
384	Q02818	<i>Nucleobindin-1</i>	<i>NUCB1</i>	3
385	Q99460	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1</i>	<i>PSMD1</i>	2
386	Q92888	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 1</i>	<i>ARHGEF1</i>	2
387	Q02790	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4</i>	<i>FKBP4</i>	2
388	P00492	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	<i>HPRT1</i>	2

389	P23921	<i>Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit</i>	RRM1	2
390	P55884	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</i>	EIF3B	2
391	Q5JTD0	<i>Tight junction-associated protein 1</i>	TJAP1	2
392	P60891	<i>Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1</i>	PRPS1	2
393	P13667	<i>Protein disulfide-isomerase A4</i>	PDIA4	2
394	Q9BXJ9	<i>N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit</i>	NAA15	2
395	Q14444	<i>Caprin-1</i>	CAPRIN1	2
396	P00505	<i>Aspartate aminotransferase, mitochondrial</i>	GOT2	2
397	P62807	<i>Histone H2B type 1-C/E/F/G/I</i>	HIST1H2B C	32
398	Q8IUE6	<i>Histone H2A type 2-B</i>	HIST2H2A B	8
399	P50995	<i>Annexin A11</i>	ANXA11	3
400	P25205	<i>DNA replication licensing factor MCM3</i>	MCM3	3
401	P60981	<i>Destrin</i>	DSTN	3
402	P05787	<i>Keratin, type II cytoskeletal 8</i>	KRT8	3
403	P43246	<i>DNA mismatch repair protein Msh2</i>	MSH2	2
404	Q9BVK6	<i>Transmembrane emp24 domain-containing protein 9</i>	TMED9	3
405	P14868	<i>Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	DARS	2
406	O95801	<i>Tetratricopeptide repeat protein 4</i>	TTC4	2
407	Q15021	<i>Condensin complex subunit 1</i>	NCAPD2	2
408	Q9UMS4	<i>Pre-mRNA-processing factor 19</i>	PRPF19	2
409	Q9BPX3	<i>Condensin complex subunit 3</i>	NCAPG	2
410	P37837	<i>Transaldolase</i>	TALDO1	2
411	Q00534	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>	CDK6	2
412	P06703	<i>Protein S100-A6</i>	S100A6	2
413	Q7Z3K3	<i>Pogo transposable element with ZNF domain</i>	POGZ	2
414	Q08945	<i>FACT complex subunit SSRP1</i>	SSRP1	2
415	P52907	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-1</i>	CAPZA1	2

416	Q9Y3B8	<i>Oligoribonuclease, mitochondrial</i>	REXO2	2
417	Q12907	<i>Vesicular integral-membrane protein VIP36</i>	LMAN2	3
418	Q07065	<i>Cytoskeleton-associated protein 4</i>	CKAP4	4
419	P06132	<i>Uroporphyrinogen decarboxylase</i>	UROD	2
420	P61923	<i>Coatomer subunit zeta-1</i>	COPZ1	2
421	Q14203	<i>Dynactin subunit 1</i>	DCTN1	2
422	P18583	<i>Protein S</i>	SON	2
423	Q8N766	<i>ER membrane protein complex subunit 1</i>	EMC1	2
424	Q9Y3B4	<i>Splicing factor 3B subunit 6</i>	SF3B6	2
425	P11388	<i>DNA topoisomerase 2-alpha</i>	TOP2A	2
426	Q15459	<i>Splicing factor 3A subunit 1</i>	SF3A1	2
427	P28838	<i>Cytosol aminopeptidase</i>	LAP3	2
428	Q15785	<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM34</i>	TOMM34	2
429	P49588	<i>Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	AARS	2
430	P28070	<i>Proteasome subunit beta type-4</i>	PSMB4	2
431	P49207	<i>60S ribosomal protein L34</i>	RPL34	2
432	P00387	<i>NADH-cytochrome b5 reductase 3</i>	CYB5R3	2
433	Q9Y6E0	<i>Serine/threonine-protein kinase 24</i>	STK24	2
434	Q86XP3	<i>ATP-dependent RNA helicase DDX42</i>	DDX42	2
435	P35611	<i>Alpha-adducin</i>	ADD1	2
436	Q9Y265	<i>RuvB-like 1</i>	RUVBL1	2
437	Q99615	<i>DnaJ homolog subfamily C member 7</i>	DNAJC7	2
438	P11387	<i>DNA topoisomerase 1</i>	TOP1	2
439	Q6NZI2	<i>Polymerase I and transcript release factor</i>	PTRF	2
440	Q9Y6E2	<i>Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2</i>	BZW2	2
441	Q9UNS2	<i>COP9 signalosome complex subunit 3</i>	COPS3	2
442	P46778	<i>60S ribosomal protein L21</i>	RPL21	3
443	P04844	<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2</i>	RPN2	2
444	Q01105	<i>Protein SET</i>	SET	4

445	Q96HE7	<i>ERO1-like protein alpha</i>	<i>ERO1A</i>	3
446	Q9NR28	<i>Diablo homolog, mitochondrial</i>	<i>DIABLO</i>	3
447	P49721	<i>Proteasome subunit beta type-2</i>	<i>PSMB2</i>	2
448	O43324	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1</i>	<i>EEF1E1</i>	2
449	Q8WVJ2	<i>NudC domain-containing protein 2</i>	<i>NUDCD2</i>	2
450	P52209	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating</i>	<i>PGD</i>	3
451	P02545	<i>Prelamin-A/C</i>	<i>LMNA</i>	2
452	Q16630	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6</i>	<i>CPSF6</i>	2
453	O95232	<i>Luc7-like protein 3</i>	<i>LUC7L3</i>	2
454	Q9BR76	<i>Coronin-1B</i>	<i>CORO1B</i>	2
455	P10644	<i>cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit</i>	<i>PRKAR1A</i>	2
456	O43615	<i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44</i>	<i>TIMM44</i>	2
457	Q9H0S4	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47</i>	<i>DDX47</i>	2
458	Q01081	<i>Splicing factor U2AF 35 kDa subunit</i>	<i>U2AF1</i>	2
459	P62495	<i>Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1</i>	<i>ETF1</i>	2
460	P43487	<i>Ran-specific GTPase-activating protein</i>	<i>RANBP1</i>	2
461	P39019	<i>40S ribosomal protein S19</i>	<i>RPS19</i>	3
462	P12955	<i>Xaa-Pro dipeptidase</i>	<i>PEPD</i>	2
463	O43681	<i>ATPase ASNA1</i>	<i>ASNA1</i>	2
464	Q96CT7	<i>Coiled-coil domain-containing protein 124</i>	<i>CCDC124</i>	2
465	Q14247	<i>Src substrate cortactin</i>	<i>CTTN</i>	2
466	Q9Y3B7	<i>39S ribosomal protein L11, mitochondrial</i>	<i>MRPL11</i>	2
467	Q99873	<i>Protein arginine N-methyltransferase 1</i>	<i>PRMT1</i>	2
468	Q14011	<i>Cold-inducible RNA-binding protein</i>	<i>CIRBP</i>	2
469	Q13642	<i>Four and a half LIM domains protein 1</i>	<i>FHL1</i>	2
470	P62829	<i>60S ribosomal protein L23</i>	<i>RPL23</i>	2
471	P59998	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 4</i>	<i>ARPC4</i>	3

472	P08708	40S ribosomal protein S17	RPS17	2
473	P07339	Cathepsin D	CTSD	2
474	P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	GLUD1	2
475	O60888	Protein CutA	CUTA	3
476	Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	STRAP	2
477	Q9BW60	Elongation of very long chain fatty acids protein 1	ELOVL1	2
478	Q15437	Protein transport protein Sec23B	SEC23B	2
479	Q15427	Splicing factor 3B subunit 4	SF3B4	2
480	Q15050	Ribosome biogenesis regulatory protein homolog	RRS1	2
481	P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	ADSS	2
482	P30044	Peroxiredoxin-5, mitochondrial	PRDX5	2
483	O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial	ATP5H	2
484	O75607	Nucleoplasmin-3	NPM3	2
485	Q9UI30	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein	TRMT112	2
486	Q9BPX5	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	ARPC5L	2
487	Q15631	Translin	TSN	2
488	P62304	Small nuclear ribonucleoprotein E	SNRPE	2
489	P56134	ATP synthase subunit f, mitochondrial	ATP5J2	2
490	P43307	Translocon-associated protein subunit alpha	SSR1	2
491	P31949	Protein S100-A11	S100A11	4
492	P25787	Proteasome subunit alpha type-2	PSMA2	2
493	O95336	6-phosphogluconolactonase	PGLS	2
494	Q9BY32	Inosine triphosphate pyrophosphatase	ITPA	2
495	Q15185	Prostaglandin E synthase 3	PTGES3	2
496	P60866	40S ribosomal protein S20	RPS20	2
497	P35237	Serpin B6	SERPINB6	2
498	O43684	Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3	2
499	Q9BRA2	Thioredoxin domain-containing protein 17	TXNDC17	2

500	Q96FQ6	<i>Protein S100-A16</i>	S100A16	2
501	P67870	<i>Casein kinase II subunit beta</i>	CSNK2B	2
502	Q96PK6	<i>RNA-binding protein 14</i>	RBM14	2
503	P15311	<i>Ezrin</i>	EZR	3
504	P20290	<i>Transcription factor BTF3</i>	BTF3	3
505	O95347	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 2</i>	SMC2	2
506	Q1KMD3	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2</i>	HNRNPUL2	2
507	P23526	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	AHCY	2
508	P62280	<i>40S ribosomal protein S11</i>	RPS11	2
509	O75396	<i>Vesicle-trafficking protein SEC22b</i>	SEC22B	2
510	O75694	<i>Nuclear pore complex protein Nup155</i>	NUP155	2
511	P60228	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E</i>	EIF3E	2
512	P67809	<i>Nuclease-sensitive element-binding protein 1</i>	YBX1	2
513	Q8N183	<i>Mimitin, mitochondrial</i>	NDUFAF2	2
514	P10768	<i>S-formylglutathione hydrolase</i>	ESD	2
515	P61313	<i>60S ribosomal protein L15</i>	RPL15	2
516	Q9NR56	<i>Muscleblind-like protein 1</i>	MBNL1	2
517	O43707	<i>Alpha-actinin-4</i>	ACTN4	14
518	Q9NP77	<i>RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72</i>	SSU72	2
519	Q6PKG0	<i>La-related protein 1</i>	LARP1	2
520	Q00325	<i>Phosphate carrier protein, mitochondrial</i>	SLC25A3	2
521	Q9H7B2	<i>Ribosome production factor 2 homolog</i>	RPF2	2
522	Q9Y3L5	<i>Ras-related protein Rap-2c</i>	RAP2C	2
523	P14866	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L</i>	HNRNPL	2
524	O15372	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H</i>	EIF3H	2
525	P55060	<i>Exportin-2</i>	CSE1L	2
526	P20674	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial</i>	COX5A	2

527	Q96AG4	<i>Leucine-rich repeat-containing protein 59</i>	LRRC59	3
528	Q9NQR4	<i>Omega-amidase NIT2</i>	NIT2	2
529	Q14566	<i>DNA replication licensing factor MCM6</i>	MCM6	2
530	Q16513	<i>Serine/threonine-protein kinase N2</i>	PKN2	2
531	Q9H8Y8	<i>Golgi reassembly-stacking protein 2</i>	GORASP2	2
532	P04080	<i>Cystatin-B</i>	CSTB	2
533	P50579	<i>Methionine aminopeptidase 2</i>	METAP2	2
534	Q10567	<i>AP-1 complex subunit beta-1</i>	AP1B1	2
535	Q9BQE3	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	TUBA1C	21
536	P20042	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2</i>	EIF2S2	2
537	P30084	<i>Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial</i>	ECHS1	2
538	P14927	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 7</i>	UQCRB	2
539	Q9Y490	<i>Talin-1</i>	TLN1	2
540	Q14061	<i>Cytochrome c oxidase copper chaperone</i>	COX17	2
541	P17980	<i>26S protease regulatory subunit 6A</i>	PSMC3	2
542	Q8N9T8	<i>Protein KRI1 homolog</i>	KRI1	2
543	P15144	<i>Aminopeptidase N</i>	ANPEP	3
544	P46779	<i>60S ribosomal protein L28</i>	RPL28	3
545	Q9UL46	<i>Proteasome activator complex subunit 2</i>	PSME2	3
546	P48147	<i>Prolyl endopeptidase</i>	PREP	2
547	Q13573	<i>SNW domain-containing protein 1</i>	SNW1	2
548	Q06210	<i>Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase (isomerizing) 1</i>	GFPT1	2
549	Q9NQG5	<i>Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B</i>	RPRD1B	2
550	Q9UNP9	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E</i>	PPIE	2
551	P53396	<i>ATP-citrate synthase</i>	ACLY	2
552	P46821	<i>Microtubule-associated protein 1B</i>	MAP1B	2
553	Q13907	<i>Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1</i>	IDI1	2
554	P18621	<i>60S ribosomal protein L17</i>	RPL17	2

555	P54725	<i>UV excision repair protein RAD23 homolog A</i>	RAD23A	2
556	P30085	<i>UMP-CMP kinase</i>	CMPK1	2
557	O75306	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 2, mitochondrial</i>	NDUFS2	2
558	Q12931	<i>Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial</i>	TRAP1	2
559	P45973	<i>Chromobox protein homolog 5</i>	CBX5	2
560	O14979	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like</i>	HNRNPDL	4
561	Q01085	<i>Nucleolysin TIAR</i>	TIAL1	2
562	P17812	<i>CTP synthase 1</i>	CTPS1	2
563	Q9BVA1	<i>Tubulin beta-2B chain</i>	TUBB2B	22
564	P26368	<i>Splicing factor U2AF 65 kDa subunit</i>	U2AF2	2
565	Q8WXF1	<i>Paraspeckle component 1</i>	PSPC1	2
566	Q15819	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2</i>	UBE2V2	4
567	Q9NQC3	<i>Reticulon-4</i>	RTN4	2
568	P15531	<i>Nucleoside diphosphate kinase A</i>	NME1	3
569	Q00341	<i>Vigilin</i>	HDLBP	2
570	P60903	<i>Protein S100-A10</i>	S100A10	2
571	P68032	<i>Actin, alpha cardiac muscle 1</i>	ACTC1	29
572	P68366	<i>Tubulin alpha-4A chain</i>	TUBA4A	19
573	Q05639	<i>Elongation factor 1-alpha 2</i>	EEF1A2	13
574	Q6FI13	<i>Histone H2A type 2-A</i>	HIST2H2A A3	9
575	P27348	<i>14-3-3 protein theta</i>	YWHAQ	6
576	P0DMV9	<i>Heat shock 70 kDa protein 1B</i>	HSPA1B	4
577	P09493	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	TPM1	4
578	P0DMR1	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 4</i>	HNRNPCL 4	4
579	P35241	<i>Radixin</i>	RDX	3
580	P52789	<i>Hexokinase-2</i>	HK2	3
581	O15347	<i>High mobility group protein B3</i>	HMGB3	4
582	P83916	<i>Chromobox protein homolog 1</i>	CBX1	2

583	Q14151	<i>Scaffold attachment factor B2</i>	SAFB2	2
584	P16989	<i>Y-box-binding protein 3</i>	YBX3	2
585	P61225	<i>Ras-related protein Rap-2b</i>	RAP2B	2
586	P38159	<i>RNA-binding motif protein, X chromosome</i>	RBMX	2
587	O75489	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3, mitochondrial</i>	NDUFS3	2
588	P52701	<i>DNA mismatch repair protein Msh6</i>	MSH6	2
589	P49454	<i>Centromere protein F</i>	CENPF	2
590	P21964	<i>Catechol O-methyltransferase</i>	COMT	2
591	Q86SE5	<i>RNA-binding Raly-like protein</i>	RALYL	2
592	Q99622	<i>Protein C10</i>	C12orf57	2
593	Q99848	<i>Probable rRNA-processing protein EBP2</i>	EBNA1BP2	2
594	Q13151	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0</i>	HNRNPA0	2
595	Q99459	<i>Cell division cycle 5-like protein</i>	CDC5L	2
596	Q9HC38	<i>Glyoxalase domain-containing protein 4</i>	GLOD4	2
597	Q59GN2	<i>Putative 60S ribosomal protein L39-like 5</i>	RPL39P5	2
598	P62633	<i>Cellular nucleic acid-binding protein</i>	CNBP	3
599	P27695	<i>DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase</i>	APEX1	2
600	P62888	<i>60S ribosomal protein L30</i>	RPL30	2
601	P98179	<i>RNA-binding protein 3</i>	RBM3	2

Nº: número. ACC. Nº: acesion number, número identificativo de la proteína acuerdo a las bases de datos SwissProt y TrEMBL. Pep: número de péptidos utilizados en la identificación de las proteínas con al menos un 95% de confianza.

Anexo II- Tabla 2 Total de 78 proteínas identificadas que se asocian con la función mitocondrial.

Nº	ACC. Nº	NOMBRE PROTEÍNA	SÍMBOLO GEN	PEP (95%)
1	P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	21
2	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	23
3	P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	ATIC	11
4	P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	14
5	P49327	Fatty acid synthase	FASN	11
6	P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	11
7	P60174	Triosephosphate isomerase	TPI1	10
8	P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	9
9	P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1	9
10	P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	10
11	P05141	ADP/ATP translocase 2	SLC25A5	7
12	Q99623	Prohibitin-2	PHB2	7
13	P62269	40S ribosomal protein S18	RPS18	8
14	P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	9
15	P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	LRPPRC	6
16	P34897	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	SHMT2	6
17	P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	6
18	P33316	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	DUT	7
19	Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	6
20	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1QBP	6
21	P62244	40S ribosomal protein S15a	RPS15A	4
22	P07237	Protein disulfide-isomerase	P4HB	5
23	P22234	Multifunctional protein ADE2	PAICS	4
24	P35232	Prohibitin	PHB	4
25	P54819	Adenylate kinase 2, mitochondrial	AK2	4

26	Q99497	Protein deglycase DJ-1	PARK7	5
27	Q9Y4W6	AFG3-like protein 2	AFG3L2	4
28	P40939	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	HADHA	4
29	P19367	Hexokinase-1	HK1	4
30	P30041	Peroxiredoxin-6	PRDX6	5
31	P00441	Superoxide dismutase (Cu - Zn)	SOD1	4
32	P54136	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	RARS	5
33	Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	CCT7	3
34	P29401	Transketolase	TKT	4
35	P40925	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	3
36	P41250	Glycine--tRNA ligase	GARS	3
37	P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	MTHFD1	3
38	P22307	Non-specific lipid-transfer protein	SCP2	3
39	Q8TAE8	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	GADD45G1 P1	3
40	P14854	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	COX6B1	5
41	O60220	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A	TIMM8A	3
42	P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	UQCRC1	3
43	P21796	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1	3
44	O14561	Acyl carrier protein, mitochondrial	NDUFAB1	2
45	P18077	60S ribosomal protein L35a	RPL35A	3
46	P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial	TUFM	2
47	P36957	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	DLST	2
48	P26639	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	TRAS	2
49	P11177	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	PDHB	2
50	P99999	Cytochrome c	CYCS	2
51	P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	2
52	Q9Y3B8	Oligoribonuclease, mitochondrial	REXO2	2

53	P28838	<i>Cytosol aminopeptidase</i>	LAP3	2
54	Q15785	<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM34</i>	TOMM34	2
55	P49207	<i>60S ribosomal protein L34</i>	RPL34	2
56	P00387	<i>NADH-cytochrome b5 reductase 3</i>	CYB5R3	2
57	Q9NR28	<i>Diablo homolog, mitochondrial</i>	DIABLO	3
58	O43615	<i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44</i>	TIMM44	2
59	Q9Y3B7	<i>39S ribosomal protein L11, mitochondrial</i>	MRPL11	2
60	P00367	<i>Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial</i>	GLUD1	2
61	P30044	<i>Peroxiredoxin-5, mitochondrial</i>	PRDX5	2
62	O75947	<i>ATP synthase subunit d, mitochondrial</i>	ATP5H	2
63	P56134	<i>ATP synthase subunit f, mitochondrial</i>	ATP5J2	2
64	Q8N183	<i>Mimitin, mitochondrial</i>	NDUFAF2	2
65	Q00325	<i>Phosphate carrier protein, mitochondrial</i>	SLC25A3	2
66	P20674	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial</i>	COX5A	2
67	Q9NQR4	<i>Omega-amidase NIT2</i>	NIT2	2
68	P30084	<i>Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial</i>	ECHS1	2
69	P14927	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 7</i>	UQCRB	2
70	Q14061	<i>Cytochrome c oxidase copper chaperone</i>	COX17	2
71	P53396	<i>ATP-citrate synthase</i>	ACLY	2
72	Q13907	<i>Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1</i>	IDI1	2
73	O75306	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 2, mitochondrial</i>	NDUFS2	2
74	Q12931	<i>Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial</i>	TRAP1	2
75	P52789	<i>Hexokinase-2</i>	HK2	3
76	O75489	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3, mitochondrial</i>	NDUFS3	2
77	P21964	<i>Catechol O-methyltransferase</i>	COMT	2
78	Q9HC38	<i>Glyoxalase domain-containing protein 4</i>	GLOD4	2

Nº: número. ACC. Nº: accession number, número identificativo de la proteína acuerdo a las bases de datos SwissProt y TrEMBL. Pep: número de péptidos utilizados en la identificación de las proteínas con al menos un 95% de confianza.

Anexo II- Tabla 3 Listado de proteínas expresadas diferencialmente en híbridos N, análisis entre haplogrupo de ADNmt J y H (N-J/N-H).

Nº	ACC. Nº	NOMBRE PROTEÍNA	SIMBOLO GEN	PEP (95%)	Ratio	DE
1	P07355	<i>Annexin A2</i>	ANXA2	19	0,38	0,1 2
2	P08670	<i>Vimentin</i>	VIM	36	0,66	0,1 3
3	P06748	<i>Nucleophosmin</i>	NPM1	31	1,92	0,4 3
4	Q92945	<i>Far upstream element-binding protein 2</i>	KHSRP	10	2,22	0,6 4
5	P84103	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 3</i>	SRSF3	7	2,31	0,6 3
6	P61604	<i>10 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	HSPE1	9	2,50	0,6 5
7	P46013	<i>Proliferation marker protein Ki-67</i>	MKI67	6	2,61	1,1 4
8	P31948	<i>Stress-induced-phosphoprotein 1</i>	STIP1	12	2,67	0,9 4
9	P61978	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>	HNRNPK	8	2,71	0,9 2
10	P09651	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>	HNRNPA1	21	2,74	0,6 9
11	P19338	<i>Nucleolin</i>	NCL	18	2,83	0,9 9
12	P24534	<i>Elongation factor 1-beta</i>	EEF1B2	6	2,96	0,7 1
13	P09429	<i>High mobility group protein B1</i>	HMGB1	10	3,02	1,1 2
14	P16402	<i>Histone H1.3</i>	HIST1H1D	8	3,48	1,1 1
15	Q09666	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK</i>	AHNAK	17	3,48	1,9 6
16	Q16204	<i>Coiled-coil domain-containing protein 6</i>	CCDC6	4	3,71	0,9 6
17	Q86V81	<i>THO complex subunit 4</i>	ALYREF	5	4,54	0,7 3
18	P62258	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	YWHAE	8	4,69	0,3 3

19	Q01469	<i>Fatty acid-binding protein, epidermal</i>		FABP5	7	6,10	4,8 0
		<i>Complement component 1 Q</i>					
20	Q07021	<i>subcomponent-binding mitochondrial</i>		C1QBP	6	7,10	0,6 7

Nº: número. ACC. Nº: accession number, número identificativo de las proteínas de acuerdo a las bases de datos SwissProt y TrEMBL. Pep: número de péptidos utilizados en la identificación de las proteínas con al menos un 95% de confianza. Ratio: media del ratio iTRAQ (n=4) que representa la abundancia de las proteínas identificadas entre híbridos N-J y N-H calculado por el software Protein Pilot 3.0. DE: desviación estándar. Rojo: proteínas incrementadas en N-J frente N-H. Verde: proteínas disminuidas en N-J frente N-H.

Anexo II- Tabla 4 Listado de proteínas expresadas diferencialmente en híbridos OA, análisis entre haplogrupo de ADNmt J y H (OA-J/OA-H).

Nº	ACC. Nº	NOMBRE PROTEÍNA	SIMBOLO GEN	PEP (95%)	Ratio	DE
1	P35637	RNA-binding protein FUS	FUS	5	0,11	0,04
2	O43852	Calumenin	CALU	4	0,15	0,04
3	P35659	Protein DEK	DEK	6	0,16	0,03
4	Q9BTT0	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ANP32E	3	0,19	0,13
5	P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1	9	0,20	0,07
6	P16402	Histone H1.3	HIST1H1D	8	0,21	0,05
7	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1QBP	6	0,22	0,12
8	P39687	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	ANP32A	6	0,22	0,07
9	Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	EIF4H	3	0,22	0,08
10	P09429	High mobility group protein B1	HMGB1	10	0,24	0,02
11	Q86V81	THO complex subunit 4	ALYREF	5	0,24	0,09
12	P33316	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	DUT	7	0,24	0,04
13	Q16204	Coiled-coil domain-containing protein 6	CCDC6	4	0,25	0,04
14	Q15637	Splicing factor 1	SF1	4	0,25	0,06
15	P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	8	0,26	0,10
16	P19338	Nucleolin	NCL	18	0,26	0,10
17	P06748	Nucleophosmin	NPM1	31	0,26	0,09
18	Q13435	Splicing factor 3B subunit 2	SF3B2	6	0,27	0,03
19	Q96C19	EF-hand domain-containing protein D2	EFHD2	5	0,27	0,13
20	Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1	FUBP1	6	0,27	0,08
21	P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14	5	0,28	0,03
22	P46013	Proliferation marker protein Ki-67	MKI67	6	0,28	0,03

23	O14561	<i>Acyl carrier protein, mitochondrial</i>	NDUFAB1	2	0,28	0,09
24	P00441	<i>Superoxide dismutase (Cu - Zn)</i>	SOD1	4	0,29	0,07
25	P27797	<i>Calreticulin</i>	CALR	12	0,29	0,05
26	P62158	<i>Calmodulin</i>	CALM1	4	0,30	0,20
27	Q07955	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 1</i>	SRSF1	4	0,30	0,04
28	Q01469	<i>Fatty acid-binding protein, epidermal</i>	FABP5	7	0,31	0,08
29	Q99729	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B</i>	HNRNPAB	6	0,31	0,11
30	P84103	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 3</i>	SRSF3	7	0,32	0,07
31	Q09666	<i>Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK</i>	AHNAK	17	0,32	0,22
32	Q8NC51	<i>Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein</i>	SERBP1	2	0,33	0,04
33	P30040	<i>Endoplasmic reticulum resident protein 29</i>	ERP29	4	0,33	0,08
34	O60220	<i>Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A</i>	TIMM8A	3	0,33	0,15
35	P22626	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	HNRNPA2B1	14	0,34	0,09
36	P23528	<i>Cofilin-1</i>	CFL1	9	0,36	0,01
37	P31948	<i>Stress-induced-phosphoprotein 1</i>	STIP1	12	0,37	0,16
38	Q92945	<i>Far upstream element-binding protein 2</i>	KHSRP	10	0,38	0,04
39	P07237	<i>Protein disulfide-isomerase</i>	P4HB	5	0,40	0,02
40	P23246	<i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i>	SFPQ	6	0,40	0,07
41	P24534	<i>Elongation factor 1-beta</i>	EEF1B2	6	0,41	0,09
42	P09936	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1</i>	UCHL1	6	0,41	0,06
43	P63241	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5A-1</i>	EIF5A	12	0,42	0,01
44	P30101	<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	PDIA3	9	0,45	0,12
45	P38646	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	HSPA9	10	0,45	0,19
46	P07737	<i>Profilin-1</i>	PFN1	14	0,48	0,04
47	P37802	<i>Transgelin-2</i>	TAGLN2	10	0,48	0,10
48	P55209	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 1</i>	NAP1L1	9	0,50	0,08

49	P54819	<i>Adenylate kinase 2, mitochondrial</i>	AK2	4	0,50	0,12
50	P62937	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	PPIA	24	0,53	0,10
51	P04083	<i>Annexin A1</i>	ANXA1	7	0,54	0,04
52	P10809	<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	HSPD1	21	0,62	0,02
53	Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>	PRDX1	8	0,64	0,10
54	P00558	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	PGK1	10	1,78	0,42
55	P78527	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>	PRKDC	16	1,88	0,44
56	P49368	<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>	CCT3	8	1,95	0,27
57	P07900	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	HSP90AA1	26	2,21	0,71
58	P48643	<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	CCT5	10	2,26	0,36
59	P12956	<i>X-ray repair cross-complementing protein 6</i>	XRCC6	6	2,41	0,34
60	Q14204	<i>Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1</i>	DYNC1H1	12	2,47	0,50
61	P22314	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	UBA1	5	2,50	0,28
62	P08670	<i>Vimentin</i>	VIM	36	2,50	0,91
63	P17844	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5</i>	DDX5	8	2,61	0,41
64	P15880	<i>40S ribosomal protein S2</i>	RPS2	5	2,73	1,03
65	Q00610	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	CLTC	12	2,83	0,91
66	P49327	<i>Fatty acid synthase</i>	FASN	11	3,35	0,81
67	P40227	<i>T-complex protein 1 subunit zeta</i>	CCT6A	5	3,42	1,22
68	P05023	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</i>	ATP1A1	6	3,57	0,25
69	P78371	<i>T-complex protein 1 subunit beta</i>	CCT2	10	3,94	1,66
70	P26641	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	EEF1G	7	4,38	2,60
71	P60842	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	EIF4A1	13	4,47	2,57
72	P36578	<i>60S ribosomal protein L4</i>	RPL4	6	4,62	2,79
73	P62701	<i>40S ribosomal protein S4, X isoform</i>	RPS4X	8	4,91	3,55
74	P47897	<i>Glutamine--tRNA ligase</i>	QARS	7	5,01	3,38
75	P13639	<i>Elongation factor 2</i>	EEF2	26	5,93	2,88

N^o: número. ACC. N^o: accession number, número identificativo de las proteínas de acuerdo a las bases de datos SwissProt y TrEMBL. Pep: número de péptidos utilizados en la identificación de las proteínas con al menos un 95% de confianza. Ratio: media del ratio iTRAQ (n=4) que representa la abundancia de las proteínas identificadas entre híbridos OA-J y OA-H calculado por el software Protein Pilot 3.0. DE: desviación estándar. Rojo: proteínas incrementadas en OA-J frente OA-H. Verde: proteínas disminuidas en OA-J frente OA-H.

Anexo II- Tabla 5 Listado de proteínas expresadas diferencialmente en híbridos H, análisis entre N y OA (H-N/H-OA).

Nº	ACC. Nº	NOMBRE PROTEÍNA	SIMBOLO GEN	PEP (95%)	Ratio	DE
1	P05023	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</i>	ATP1A1	6	0,22	0,04
2	P36578	<i>60S ribosomal protein L4</i>	RPL4	6	0,24	0,17
3	P78371	<i>T-complex protein 1 subunit beta</i>	CCT2	10	0,27	0,13
4	P18124	<i>60S ribosomal protein L7</i>	RPL7	4	0,27	0,22
5	P60842	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-I</i>	EIF4A1	13	0,32	0,20
6	P13639	<i>Elongation factor 2</i>	EEF2	26	0,34	0,28
7	Q00610	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	CLTC	12	0,34	0,13
8	P08670	<i>Vimentin</i>	VIM	36	0,35	0,06
9	P17844	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5</i>	DDX5	8	0,37	0,06
10	Q14204	<i>Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1</i>	DYNC1H1	12	0,39	0,08
11	P12956	<i>X-ray repair cross-complementing protein 6</i>	XRCC6	6	0,41	0,06
12	P22314	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	UBA1	5	0,44	0,04
13	P48643	<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	CCT5	10	0,48	0,08
14	P07355	<i>Annexin A2</i>	ANXA2	19	0,55	0,07
15	P14618	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	PKM	33	0,55	0,22
16	P00558	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	PGK1	10	0,62	0,19
17	O60506	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i>	SYNCRIP	12	1,64	0,24
18	Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>	PRDX1	8	1,70	0,27
19	P62937	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	PPIA	24	1,71	0,33
20	Q14157	<i>Ubiquitin-associated protein 2-like</i>	UBAP2L	4	1,89	0,01
21	P23246	<i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i>	SFPQ	6	2,33	0,14
22	P55209	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 1</i>	NAP1L1	9	2,49	0,64
23	P10599	<i>Thioredoxin</i>	TXN	5	2,54	1,02
24	P37802	<i>Transgelin-2</i>	TAGLN2	10	2,64	0,44

25	Q99729	Heterogeneous ribonucleoprotein A/B	nuclear	HNRNPA B	6	2,69	0,66
26	P33316	Deoxyuridine nucleotidohydrolase, mitochondrial	5'-triphosphate	DUT	7	2,97	0,87
27	P22626	Heterogeneous ribonucleoproteins A2/B1	nuclear	HNRNPA 2B1	14	3,08	0,60
28	P06748	Nucleophosmin		NPM1	31	3,10	0,63
29	Q92945	Far upstream element-binding protein 2		KHSRP	10	3,12	0,81
30	P24534	Elongation factor 1-beta		EEF1B2	6	3,12	0,53
31	P19105	Myosin regulatory light chain 12A		MYL12A	4	3,45	0,99
32	P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein		SRP14	5	3,52	0,45
33	P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3		SRSF3	7	3,67	0,82
34	P00441	Superoxide dismutase (Cu - Zn)		SOD1	4	3,67	0,59
35	P39687	Acidic leucine-rich phosphoprotein 32 family member A	nuclear	ANP32A	6	3,67	1,12
36	P16070	CD44 antigen		CD44	4	3,75	1,41
37	Q15637	Splicing factor 1		SRSF1	4	3,76	0,28
38	Q96AE4	Far upstream element-binding protein 1		FUBP1	6	3,77	0,78
39	Q13435	Splicing factor 3B subunit 2		SF3B2	6	3,81	0,93
40	P35659	Protein DEK		DEK	6	3,89	1,57
41	P19338	Nucleolin		NCL	18	3,92	1,23
42	P62995	Transformer-2 protein homolog beta		TRA2B	3	3,98	0,45
43	Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK		AHNAK	17	4,03	1,99
44	P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1		EIF5A	12	4,03	0,13
45	P46013	Proliferation marker protein Ki-67		MKI67	6	4,04	1,29
46	P23528	Cofilin-1		CFL1	9	4,04	1,90
47	P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1		STIP1	12	4,10	1,29
48	P62158	Calmodulin		CALM1	4	4,10	1,70
49	P61978	Heterogeneous ribonucleoprotein K	nuclear	HNRNPK	8	4,18	1,60
50	P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29		ERP29	4	4,19	0,48

51	Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	SRSF1	4	4,27	1,89
52	Q96C19	EF-hand domain-containing protein D2	EFHD2	5	4,35	1,04
53	Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	EIF4H	3	4,57	1,39
54	P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1	9	4,57	1,80
55	P09429	High mobility group protein B1	HMGB1	10	4,76	0,68
56	Q9UMX0	Ubiquilin-1	UBQLN1	5	4,79	3,37
57	Q04760	Lactoylglutathione lyase	GLO1	6	5,02	3,62
58	O43852	Calumenin	CALU	4	5,07	2,13
59	Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	SERBP1	2	5,15	0,52
60	P62258	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	8	5,27	0,93
61	Q16204	Coiled-coil domain-containing protein 6	CCDC6	4	5,33	0,94
62	P16402	Histone H1.3	HIST1H1D	8	5,38	1,94
63	P09012	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	SNRPA	2	5,48	1,39
64	Q86V81	THO complex subunit 4	ALYREF	5	5,88	1,99
65	P23588	Eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	1	6,20	1,00
66	Q9BTT0	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ANP32E	3	6,52	3,06
67	O60220	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 A	TIMM8A	3	7,57	4,41
68	Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5	7	8,42	6,31
69	P35637	RNA-binding protein FUS	FUS	5	10,08	0,62
70	Q07021	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1QBP	6	10,76	1,85

Nº: número. ACC. Nº: accession number, número identificativo de las proteínas de acuerdo a las bases de datos SwissProt y TrEMBL. Pep: número de péptidos utilizados en la identificación de las proteínas con al menos un 95% de confianza. Ratio: media del ratio iTRAQ (n=4) que representa la abundancia de las proteínas identificadas entre híbridos H-N y H-OA calculado por el software Protein Pilot 3.0. DE: desviación estándar. Rojo: proteínas incrementadas en H-N frente H-OA. Verde: proteínas disminuidas en H-N frente H-OA.

Anexo II- Tabla 6 Listado de proteínas expresadas diferencialmente en híbridos J, análisis entre N y OA (J-N/J-OA).

Nº	ACC. Nº	NOMBRE PROTÍNA	SIMBOLO GEN	PEP (95%)	Ratio	DE
1	P35637	RNA-binding protein FUS	FUS	5	0,17	0,06
2	P35659	Protein DEK	DEK	6	0,24	0,05
3	Q86V81	THO complex subunit 4	ALYREF	5	0,29	0,07
4	P16402	Histone H1.3	HIST1H1D	8	0,31	0,04
5	P61604	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPE1	9	0,32	0,10
6	P62158	Calmodulin	CALM1	4	0,33	0,19
7	P33316	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	DUT	7	0,37	0,05
8	P19338	Nucleolin	NCL	18	0,37	0,15
9	P09429	High mobility group protein B1	HMGB1	10	0,41	0,14
10	P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14	5	0,41	0,06
11	P06748	Nucleophosmin	NPM1	31	0,42	0,15
12	P24534	Elongation factor 1-beta	EEF1B2	6	0,45	0,13
13	P46013	Proliferation marker protein Ki-67	MKI67	6	0,45	0,14
14	P27797	Calreticulin	CALR	12	0,46	0,07
15	P84103	Serine/arginine-rich splicing factor 3	SRSF3	7	0,53	0,13
16	P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1	12	0,58	0,26
17	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	37	1,44	0,33
18	P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	13	1,67	0,33
19	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	33	1,76	0,09
20	P07355	Annexin A2	ANXA2	19	2,18	0,72

Nº: número. ACC. Nº: accesion number, número identificativo de las proteínas de acuerdo a las bases de datos SwissProt y TrEMBL. Pep: número de péptidos utilizados en la identificación de las proteínas con al menos un 95% de confianza. Ratio: media del ratio iTRAQ (n=4) que representa la abundancia de las proteínas identificadas entre híbridos J-N y J-OA calculado por el software Protein Pilot 3.0. DE: desviación estándar. Rojo: proteínas incrementadas en J-N frente J-OA. Verde: proteínas disminuidas en J-N frente J-OA.

ANEXO III Artículos establecidos a partir de este trabajo de tesis

- Fernandez-Moreno M; Hermida-Gomez T; Esther-Gallardo M; **Dalmao-Fernández A**; Rego-Pérez I; Garesse R; Blanco F Generating Rho-0 Cells using Mesenchymal Stem Cell Lines. PLoS One. 2016. PMID: 27764131 (FI 2,8; Q1).
- **Dalmao-Fernandez A**; Hermida-Gomez T; Lund J; Vazquez-Mosquera ME; Rego-Perez I; Garesse R; Blanco F; Fernandez-Moreno M. mtDNA from osteoarthritis patients drives functional impairment of mitochondrial activity: a study on transmitochondrial cybrids. (Pendiente de revisión en Cytotherapy (FI 4,29: Q1).
- **Dalmao-Fernandez A**; Lund J; Hermida-Gomez T; Vazquez-Mosquera ME; Rego-Perez I; Blanco F; Moreno-Fernandez M. Impaired metabolic flexibility in the osteoarthritis process – a study on transmitochondrial cybrids. Cells 2020 (FI 5,65; Q1).

RESEARCH ARTICLE

Generating Rho-0 Cells Using Mesenchymal Stem Cell Lines

Mercedes Fernández-Moreno¹, Tamara Hermida-Gómez¹, M. Esther Gallardo², Andrea Dalmao-Fernández¹, Ignacio Rego-Pérez¹, Rafael Garesse², Francisco J. Blanco^{1*}

1 Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas, Universidade da Coruña (UDC), A Coruña, Spain, **2** Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” UAM-CSIC, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

* fblagar@sergas.es



OPEN ACCESS

Citation: Fernández-Moreno M, Hermida-Gómez T, Gallardo ME, Dalmao-Fernández A, Rego-Pérez I, Garesse R, et al. (2016) Generating Rho-0 Cells Using Mesenchymal Stem Cell Lines. PLoS ONE 11 (10): e0164199. doi:10.1371/journal.pone.0164199

Editor: Robert W Dettman, Northwestern University, UNITED STATES

Received: April 6, 2016

Accepted: September 21, 2016

Published: October 20, 2016

Copyright: © 2016 Fernández-Moreno et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by grants from Fundacion Española de Reumatología (programa GEN-SER) and Fondo de Investigación Sanitaria CIBERC06/01/0040-Spain, PI 12/329 and PI14/01254, integrated in the National Plan for Scientific Program, Development and Technological Innovation 2013-2016, and funded by the ISCIII-General Subdirection of Assessment and Promotion of Research-European Regional

Abstract

Introduction

The generation of Rho-0 cells requires the use of an immortalization process, or tumor cell selection, followed by culture in the presence of ethidium bromide (EtBr), incurring the drawbacks its use entails. The purpose of this work was to generate Rho-0 cells using human mesenchymal stem cells (hMSCs) with reagents having the ability to remove mitochondrial DNA (mtDNA) more safely than by using EtBr.

Methodology

Two immortalized hMSC lines (3a6 and KP) were used; 143B.TK-Rho-0 cells were used as reference control. For generation of Rho-0 hMSCs, cells were cultured in medium supplemented with each tested reagent. Total DNA was isolated and mtDNA content was measured by real-time polymerase chain reaction (PCR). Phenotypic characterization and gene expression assays were performed to determine whether 3a6 Rho-0 hMSCs maintain the same stem properties as untreated 3a6 hMSCs. To evaluate whether 3a6 Rho-0 hMSCs had a phenotype similar to that of 143B.TK-Rho-0 cells, in terms of reactive oxygen species (ROS) production, apoptotic levels and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) were measured by flow cytometry and mitochondrial respiration was evaluated using a SeaHorse XFp Extracellular Flux Analyzer. The differentiation capacity of 3a6 and 3a6 Rho-0 hMSCs was evaluated using real-time PCR, comparing the relative expression of genes involved in osteogenesis, adipogenesis and chondrogenesis.

Results

The results showed the capacity of the 3a6 cell line to deplete its mtDNA and to survive in culture with uridine. Of all tested drugs, Stavudine (dt4) was the most effective in producing 3a6-Rho cells. The data indicate that hMSC Rho-0 cells continue to express the characteristic MSC cell surface receptor pattern. Phenotypic characterization showed that 3a6 Rho-

Development Fund (FEDER), "A way of making Europe." IRP is supported by Contrato Miguel Servet-Fondo de Investigación Sanitaria (CP12/03192).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

0 cells resembled 143B.TK-Rho-0 cells, indicating that hMSC Rho-0 cells are Rho-0 cells. While the adipogenic capability was higher in 3a6 Rho-0 cells than in 3a6 cells, the osteogenic and chondrogenic capacities were lower.

Conclusion

Among the drugs and conditions tested, the use of d4t was the best option for producing Rho-0 cells from hMSCs. Rho-0 cells are useful for studying the role of mitochondria in hMSC differentiation.

Introduction

Mitochondrial dysfunction is central to the pathogenesis of some monogenic syndromes. Examples of these syndromes include the MELAS syndrome (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes caused by mutation of mitochondrial transfer RNAs) [1,2] and Leigh's disease (caused by mutations in genes related to oxidative phosphorylation) [1,3,4]. In addition, there is an emerging recognition that disordered mitochondrial dynamics contribute to the pathogenesis of complex diseases not classically considered to involve mitochondria; these diseases include cancer [5,6], cardiovascular disease [7,8,9], neurodegenerative diseases [10,11] and rheumatic diseases [12–15].

In the last century, immortal cell lines have been developed that are devoid of mitochondrial DNA (mtDNA) (Rho-0 (ρ 0)) [16]. Rho-0 cells are highly valid tools to study human mitochondrial disorders because they can be used to develop a cytoplasmic hybrid (cybrid) model. This model is interesting because it allows the study of the real role of mtDNA single nucleotide polymorphisms (SNPs) with the same nuclear DNA background. Mitochondrial functions are controlled by both mtDNA and nuclear DNA; cybrids are useful for the difficult task of identifying whether the mitochondrial or nuclear genome is responsible for a particular mitochondrial defect. Cybrids are constructed by fusing a cell without a nucleus that harbors the mtDNA of interest with Rho0 cells in which endogenous mtDNA has been depleted. Cybrid cell lines have been successfully used to explore the contribution of mitochondrial dysfunction and mtDNA gene mutations to the pathogenesis of diseases, such as Parkinson's Syndrome. Because disease cybrids can be generated from patients at all stages of a disease, they provide a window into early stages of disease pathogenesis not available from pathological specimens. Therefore, Rho-0 cells represent an important tool for development of cellular models of disease, for studying the pathogenesis of some diseases, or to test the toxic effects of drugs.

The generation of Rho-0 cells is challenging and requires the use of an immortalization process followed by a lengthy culture in the presence of various low-dose drugs. Surprisingly, this does not ensure the complete depletion of mtDNA from the cells. The use of ethidium bromide (EtBr) is the most common and successful procedure to generate Rho-0 cells because EtBr possesses high capacity to intercalate into the mitochondrial double-stranded DNA, thereby interfering with enzymes of the replication machinery. However, mutagenic effects of EtBr on the nuclear genome cannot be excluded [17].

At present, most Rho-0 cells are obtained from tumor cells, with all the drawbacks that this entails [18–20]. Mesenchymal stem cells (MSCs) are stromal cells that were originally isolated from the adherent portion of bone marrow [21,22]. MSCs grow as spindle-shaped cells displaying a colony-forming capability in low density cultures and are non-hematopoietic and non-

endothelial. MSCs can be propagated through multiple passages in cell culture and differentiate into the standard osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages in appropriate media [23].

Because of the adverse effects of EtBr and the inconvenience of using tumor cells to generate Rho cells, we conducted this experiment to attempt to improve these limitations. We first tested some reagents with the ability to remove mtDNA more safely than EtBr. To this end, we selected substances with the capacity to decrease the mtDNA copy number of cells by inhibiting mitochondrial oxidative phosphorylation, interfering with mtDNA replication, or inhibiting polymerase γ [24–27]. Subsequently, we replaced tumor cell lines with hMSCs from bone marrow. Although hMSCs are readily isolated but they have limited ability to expand under standard conditions or with increasing age [28,29] and rapidly senesce in culture with restricted multilineage differentiation capacity [30,31]. For this reason we used two immortalized hMSC lines, KP and 3a6 [32,33].

Material and Methods

Cell culture of hMSCs

Two immortalized human mesenchymal/stromal cell lines (hMSCs) were used in this work, the KP and 3a6 hMSC lines. Both hMSC lines were kindly provided by Dr Hung's group.

KP cells were developed by Hung's group using hMSC isolated from a bone marrow (BM) aspirate of a 61-year-old female donor in the Veteran's General Hospital-Taipei. The KP cell line was immortalized using a retroviral vector transduction that expressed HPV16 E6/E7 [32]. KP cells were then transfected with pHTERT-IRES2-EGFP to obtain the 3a6 cell line [33]. KP cells were cultured using the Mesenchymal Stem Cell Growth Medium Bullet Kit (LONZA, Biowhittaker, Viviers, Belgium), while 3a6 cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose (DMEM-LG) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml) (P/S; Gibco, Paisley, United Kingdom) and 2 mM L-glutamine (GlutaMax, GIBCO).

The study was approved by the Ethics Committee of the Galician Health Administration.

Rho-0 cell culture

The 143B.TK-Rho-0 cell line used in all the experiments as a reference control was kindly provided by Dr Garesse's group. It was obtained from a human osteosarcoma cell line (143B.TK-) subsequently treated for 6–8 weeks with low dosage (50 ng/ml) EtBr. 143B.TK-Rho-0 cells were maintained in DMEM containing 10% FBS, P/S and 50 mg/ml uridine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Rho-0 cells need specific supplementation with uridine to sustain their viability. The uridine satisfies the energy demand of these cells and possibly generates pyrimidine despite the inhibition of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), a key enzyme in the biosynthesis of pyrimidine.

In all cases the medium was changed twice a week and subculture was performed after the cells reached 80% confluency. Cells were maintained in a 5% CO₂ and 90% humidified atmosphere at 37°C.

Generation of hMSC Rho-0 cells

Cells were plated in a 6-multiwell plate (MW-6; Corning Incorporated, Kennebunk, ME, USA) (8x10⁴ cells per well) and cultured in the appropriate medium for each type, following the same procedure (Fig 1). Cells were maintained for 24 hours in the appropriate culture medium before the medium was supplemented with each tested condition: 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide (Ethidium bromide, EtBr) (Sigma-Aldrich), Rhodamine 6g

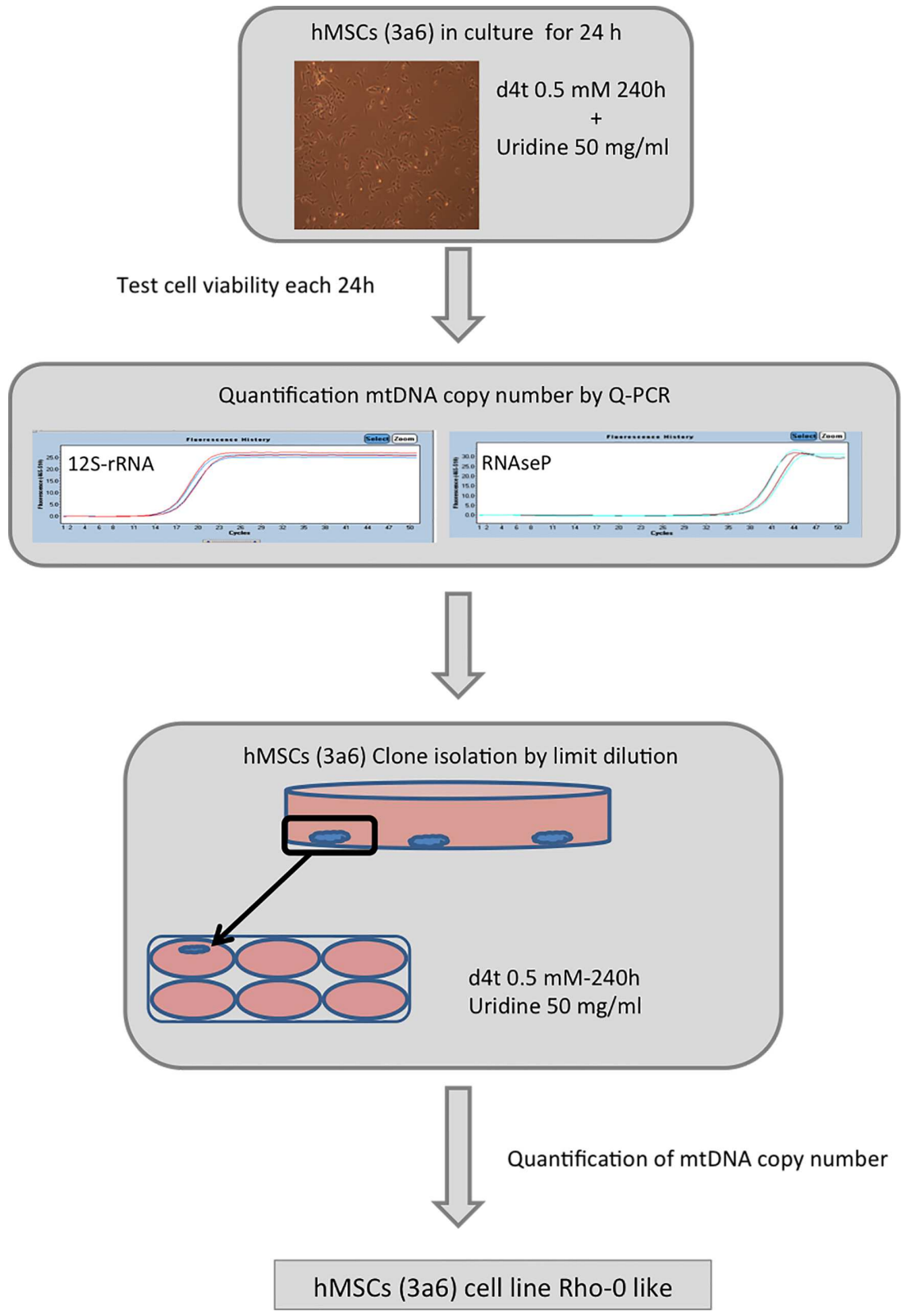


Fig 1. Work flow for generating Rho-0 Cells from human mesenchymal stem cells (hMSCs). d4t = Stavudine; mtDNA = mitochondrial DNA; Q-PCR = quantitative polymerase chain reaction; 12S-rRNA = mitochondrial 12S ribosomal gene; RNaseP = nuclear gene.

doi:10.1371/journal.pone.0164199.g001

(Rd6g) (Invitrogen, Waltham, MA, USA), 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), Zidovudine (AZT, 3'-azido-3'-deoxythymidine) or Stavudine (d4t; 2'-3'-didehydro-2'-3'-dideoxythymidine) (Sigma-Aldrich) (Table 1). Culture media were always supplemented with uridine (50 mg/ml). Drug stocks were prepared following the manufacturers' instructions and replenished at each medium change. The stocks were stored at -20°C between doses and new stocks were prepared before each experiment.

In all the experiments, cells with no treatment were used as controls to determine the baseline levels of mtDNA for each cell type. Cells cultured with EtBr were used as positive controls to assess the capacity of the different cell lines to survive with very low levels of mtDNA. 143B.TK-Rho-0 cells were used as a reference for the mtDNA content characteristic of a standard Rho-0 line.

DNA isolation and quantification of mtDNA copy number

Total DNA from untreated cells (5×10^5) and cells cultured with the test compounds (1×10^5) was isolated using a commercial kit (Qiagen, Manchester, UK), following the manufacturer's instructions.

The mtDNA content was measured by real-time polymerase chain reaction (PCR) using the LightCycler® 480 II (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The targeted genes were the mitochondrial 12S ribosomal gene (12S-rRNA) and the nuclear gene RNaseP. Duplicate DNA samples were amplified in parallel in a final volume of 20 µL containing 50 ng DNA, 10 µL of LightCycler® 480 Sybr Green I Master (Roche Diagnostics), 0.3 µM primers for 12S-rRNA (forward 5'-CCACGGGAAACAGCAGTGAT-3', reverse 5'-CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA-3') and 0.3 µM RNaseP primers (forward: 5'-GCACTGAGCACGTTGAGAGA-3'; reverse: 5'-CCAGTCGAAGAGCTCCAGA-3') with H₂O to reach the final volume. The mixture was amplified by 50 cycles at 95°C for 10 seconds, 60°C for 15 seconds and 72°C for 10 seconds; with a final extension of 72°C for 1 minute. The specificity of all reactions was determined by a melting point curve analysis using one cycle at 95°C for 5 seconds and 65°C for 1 minute followed by a heating step at 97°C with continuous fluorescence acquisition. For determining mtDNA copy number, an independent standard curve was generated for each gene (12S-rRNA and RNaseP). The total mtDNA copy number was determined from the Ct values and was extrapolated into the external standard curve. The concentration for each gene was obtained in the analyzed samples. MtDNA copy number values were expressed by the ratio 12S rRNA/RNaseP. To normalize the values between all experiments, we established the mtDNA copy number using the control cells (cells without treatment) as 100%.

Table 1. List of drugs analyzed to deplete mitochondrial DNA (mtDNA) in human mesenchymal stem cell lines (hMSCs).

Drug	Concentration	Time (Hours)
Etidium bromide (EtBr)	1 mM, 500 nM, 100 nM	168
Rhodamine-6g (Rd6g)	1 µg/ml, 3 µg/ml, 5 µg/ml	24–168
1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)	25 µM, 0.5 mM, 1 mM	72
Zidovudine (AZT)	10 µM, 20 µM, 0.5 mM	96–240
Stavudine (d4t)	5 µM, 10 µM, 100 µM, 0.5 mM	96–240

doi:10.1371/journal.pone.0164199.t001

Clone selection

For the 3a6 cell line, clone selection was performed in the presence of d4t at 0.5 mM over a 240-hour period (Fig 1). Cells were plated in a P-100 dish at very low density; 90 cells were plated (limit dilution) in DMEM-LG supplemented with 10% FBS, P/S, 0.5 mM d4t and 50 mg/ml uridine. After 24 hours cells were examined under an optical microscope and isolated cells were marked to be followed for 2–3 weeks in culture. When a single colony was formed, it was transferred to a MW-6 well. Clones were treated for 192–240 hours with the selective medium (DMEM-LG supplemented with 10% FBS, P/S, 50 mg/ml uridine and d4t 0.5 mM). At the end of this second selection time, mtDNA levels were determined and compared with those obtained for 143B.TK- Rho-0 cells (Fig 1).

These treated cells and their Rho-0 clones were stored in liquid nitrogen for further use.

Phenotypic characterization of cells by flow cytometry

Cells were harvested, centrifuged, washed, and counted prior to flow cytometry. Cells were incubated with 12 antibodies (CD29, CD34, CD45, CD69, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, CD271, STRO and SSEA4) at optimal amounts added to each tube for 1 h at 4°C. A control tube for each of the chromogens received equivalent amounts of isotype standards. Rabbit polyclonal anti-mouse IG-FITC (Dako, Barcelona, Spain) was used as a secondary antibody when necessary. 2×10^4 cells per assay were analyzed on a flow cytometer (FACsCalibur, Becton Dickinson, Madrid, Spain). Results were expressed as mean percentage of positive cells in three individual experiments (mean \pm SD).

Detection of cellular reactive oxygen species (ROS) production

Cells were plated at a density of 8×10^4 cells per well in MW-6 plates for 24 hours, then the medium was depleted and cells were incubated for one hour prior to the incubation with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate at 10 μ M (DCFH-DA, Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C in darkness. Cells were harvested by trypsin release and resuspended in saline solution prior to analysis by flow cytometry. 10^4 cells per assay were measured by flow cytometry. Data were analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson). Results were expressed as median of fluorescence (AU) and represented three independent experiments.

Detection of mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\psi_m$) and apoptotic cells

To determine mitochondrial membrane potential, cells were plated at 8×10^4 cells per well in MW-6 plates for 48 hours in DMEM with 10% FBS. Cells were harvested, washed and resuspended phosphate-buffered saline (PBS). To establish the mitochondrial membrane potential, 5 μ l of 1,1',3,3,3'-hexamethylindodicarbo-cyanine iodide (DiIc1(5) ImmunoStep, Salamanca, Spain) was added and incubated for 15 min at 37°C, 5% CO₂. To measure the MMP, we used a lipophilic fluorescent stain for labeling membranes, DiIc1(5). This dye accumulates primarily in those mitochondria having active mitochondrial membrane potentials. Staining decreases as the mitochondrial membrane potential is reduced.

For apoptosis, the cells were incubated in the presence of staurosporine at 2 μ M for 2 hours. The basal and staurosporine-conditioned cells were washed and resuspended in 1 X annexin-binding buffer followed by 5 μ l of Annexin V-FITC and 5 μ l of propidium iodide (PI) (ImmunoStep) added to each 100 μ l of cell suspension. The cells were then incubated at room temperature for 15 minutes in darkness. Following incubation, 400 μ l of 1X annexin-binding buffer was added prior to analysis by flow cytometry within one hour. 10^4 cells per assay were

measured on a flow cytometer and data obtained were analyzed by CellQuest software (Becton Dickinson). Analysis of apoptosis was performed by counting cells stained simultaneously with Annexin V-FITC and PI. This allowed the discrimination of intact cells (Annexin V-FITC and PI negative) from cells in the early apoptotic state (Annexin V-FITC positive and PI negative) and late apoptotic state (Annexin V-FITC and PI positive).

Results are expressed as percent of positive cells for each dye and represent the mean of three independent experiments (mean \pm SD).

Mitochondrial respiration

Oxygen consumption (OCR, pmoles/min), an indicator of mitochondrial respiration, was determined by direct measurement with a Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer instrument (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). 2×10^4 cells per well were seeded in XF cell culture microplates (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies) and incubated at 37°C with 5% CO₂. The next day, the cells were washed with XF assay medium supplemented with 10 mM glucose and 1 mM pyruvate and placed in a 37°C incubator without CO₂ for 1 hour. OCR was determined following the manufacturer's instructions. Briefly, for the mitochondrial stress test, ports were loaded with 2 μ M oligomycin, an ATP synthase inhibitor, 1 μ M carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone or FCCP, an oxidative phosphorylation uncoupler, and, finally, a mixture of 2 μ M Rotenone, a respiratory complex I inhibitor and 4 μ M Antimycin A, a respiratory complex III inhibitor, was added. Real time OCR was averaged and recorded three times during each conditional cycle.

Osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation

For osteogenic and adipogenic differentiation, 3×10^3 cells were seeded in wells of a MW-6 plate and cultured in growth medium for 24 hours. Osteogenesis was induced by culturing the cells in Osteogenic Differentiation Medium (Lonza, Biowhittaker). Adipogenesis was induced by culturing cells in hMSC Commercial Adipogenic Differentiation Medium (Lonza, Biowhittaker), following the manufacturer's instructions. Cultures were alternated between induction and maintenance medium every 3 days. Both differentiation processes were maintained for 9 days.

Chondrogenesis was assessed using the micropellet formation (2.5×10^4) technique [34], with some modifications. 3a6 and 3a6 Rho-0 cells were detached using trypsin and centrifuged at 300xg for 10 minutes. The resulting pellet was cultured for 21 days in hMSC Commercial Chondrogenic Differentiation Medium (Lonza, Biowhittaker) supplemented with 10 ng/ml transforming growth factor- β 3 (TGF β -3) (Prospec, Ness-Ziona, Israel). During this process the culture medium was changed every 3 days.

Staining neutral lipids

To confirm adipogenic differentiation capacity, 3a6 cells without treatment (3a6-wt) and 3a6 Rho-0 cells were cultured in adipogenic differentiation medium and the cells were then fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 10 minutes at 4°C, followed by double-staining for 30 minutes with a 1:10000 dilution of a neutral lipid dye, 4,4-Difluoro-2,3,5,6-bis-tetramethylene-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (LD540), kindly provided by Dr Thiele [35]. This step was followed by 5 minutes incubation with the nuclear dye 2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride (Hoechst 33258, Sigma-Aldrich). After washing with PBS, cover slips were mounted on microscopy chamber slides using Glycer-gel (Dako). Fluorescence was visualized and photographed under fluorescence microscopy at 20X (Olympus BX61).

RNA extraction and first strand cDNA synthesis

Total RNA from cell cultures and micropellets was extracted using Trizol[®] reagent (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. For each sample, 1 µg of total RNA was reversed transcribed using the SuperScript[®] Vilo[™] Master Mix (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time-PCR (qRT-PCR)

Real-time PCR utilized a LightCycler 480-II Instrument (Roche, Mannheim, Germany) with TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). Analysis of the results was carried out using Qbase+ version 2.5 software (Biogazelle, Gent, Belgium). Gene expression in some cases was calculated relative to the housekeeping gene (RPL13A) and in other cases relative to the basal condition. Sequence primers, probe and PCR conditions can be provided upon request.

Statistical analysis

Appropriate statistical analyses were performed using GraphPad Prism v6 software. The results are reported as mean ± SD. A p value less than 0.05 was considered significant.

Results

Generating Rho-0 cells from 3a6 human immortalized MSCs

Because this is the first time that a hMSC cell line was used to generate cells with depleted mtDNA, we first tested survivability, as well as capability to become Rho-0 cells, using classic methodology with EtBr. The results showed that the 3a6 cell line cultured with EtBr at 100 nM for a short time, 240 hours, had a 8.17% decrease of mtDNA copy number compared to 3a6 cells without treatment (3a6-wt, mtDNA copy level was established at 100%) (Fig 2A). These results demonstrate the capacity of the 3a6 cell line to deplete its mtDNA and survive in culture in the presence of uridine.

The next set of experiments studied the ability of other reagents less toxic than EtBr to reduce mtDNA copy number. 3a6 cells cultured in the presence of three different Rd6g concentrations (1, 3 and 5 µg/ml) for 168 hours showed a small decrease in mtDNA content (Fig 2B). Rd6g at 3 µg/ml for 120 hours yielded the greatest decrease in the percentage of mtDNA content, 68.5%. The highest concentration, 5 µg/ml, proved to be the least effective, with the levels of mtDNA actually increasing compared to cells without treatment (Fig 2B).

The lowest concentration of MPP⁺, 25 µM, at 72 hours of culture reduced the percentage of mtDNA copies to 41.41% compared to the control. The other two concentrations, 0.5 mM and 1 mM, produced similar results at the same time (Fig 2C). A culture time longer than 72 hours with MPP⁺ induced cell death by necrosis at all concentrations (data not shown).

Interestingly, the capacity of the two nucleosides reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) selected differed. Both AZT concentrations, 20 µM and 0.5 mM, at all culture times, increased the mtDNA levels and both concentrations showed similar effects on mtDNA copy number (Fig 2D). However, incubation of cells with Stavudine (d4t) yielded different results. Low concentrations (5 and 10 µM) did not produce a decrease in the mtDNA copy number, but high concentrations, 100 µM and 0.5 mM, incubated for 144 hours decreased mtDNA copy number to 10.84% compared to that of the control (Fig 2E). The most effective concentration and culture times for reducing mtDNA copy number in 3a6 hMSCs are summarized in Table 2.

The values obtained to this point come from a pool of cells; therefore we performed clone isolation. Cells from the 3a6 cell line were cultured in the presence of d4t at 0.5 mM for about 96 hours before selection of each clone. First, we isolated 15 clones and analyzed the mtDNA

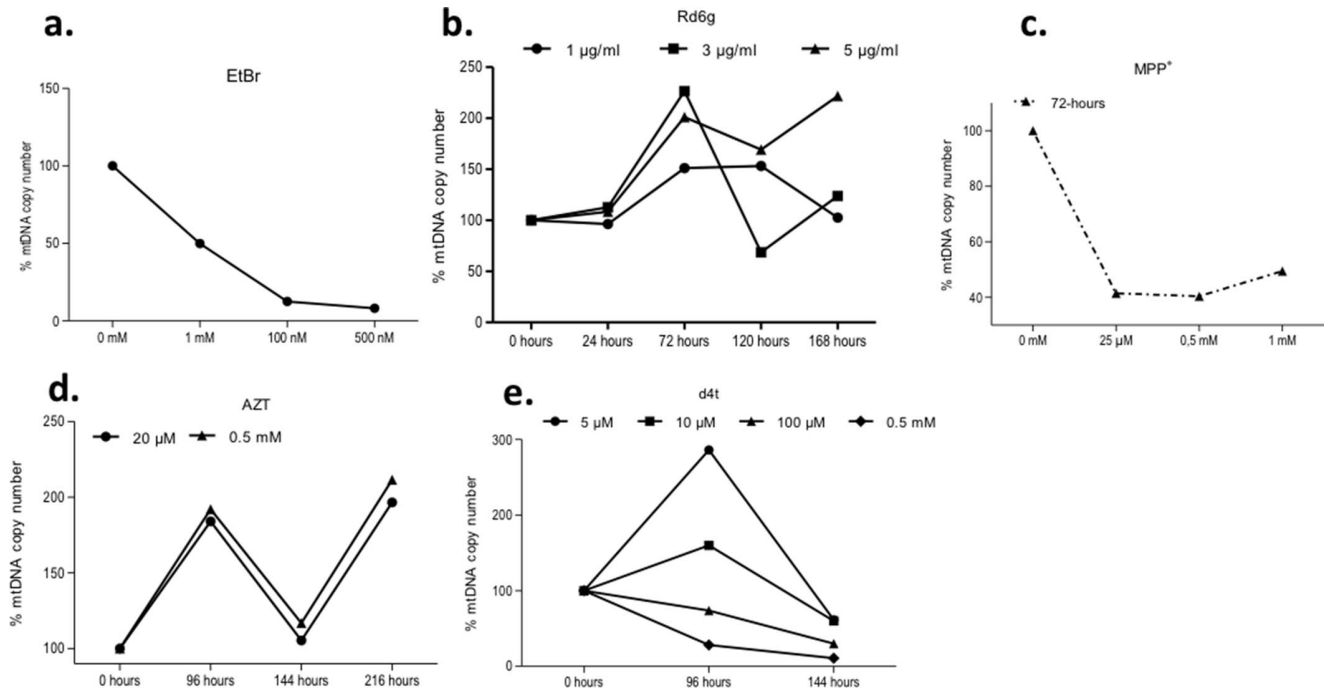


Fig 2. 3a6 cell line response to different substances capable of depleting the levels of mitochondrial DNA. All mtDNA copy numbers are expressed as percentages comparing each value with untreated cells valued at 100% (a). Treatment with ethidium bromide (EtBr) at three different concentrations (1 mM, 100 nM and 500 nM) for 240 hours. The maximum effectiveness of this treatment was at 100 nM. (b). Treatment with Rhodamine 6g at 1, 3 and 5 µg/ml for 24, 72, 120 and 168 hours. (c). Treatment with 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) at 25 µM, 0.5 mM and 1 mM for 72 hours. (d). Treatment with Zidovudine (AZT) at 20 µM and 0.5 mM, for 96, 144 and 216 hours. AZT increased mtDNA content. (e). Treatment with Stavudine (d4t) at 5, 10 and 100 µM and 0.5 mM for 96 and 144 hours. The analysis of mtDNA copy numbers reflect that treatment with the highest concentration (0.5 mM) for 144 hours decreased the levels of mtDNA in treated cells nearly 98% compared to those of untreated cells. 8x10⁴ cells were plated in each experiment for treatment with a reagent. The figures represent at least three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0164199.g002

copy number from each. The results showed variability in the mtDNA copy number ranging from 67.79% (clone-7) to 10.76% (clone-3), compared to 3a6 cells without treatment (3a6-wt) (Fig 3A). To decrease the mtDNA copy numbers detected in 3a6 clones to values similar to those described for other Rho-0 cells, such as 143B.TK- Rho-0, two 3a6 clones were selected. One, C-10, had a high mtDNA copy number; 63.68%, and the other, C-3, the lowest value for mtDNA copies, 10.76%. Both clones were cultured with uridine (50 mg/ml) and d4t (0.5 mM) for an additional 192 hours prior to analysis of the mtDNA copy number. The results showed that both selected clones had obtained a low number of copies when compared to their parental line, 0.80% for C-3 and 1.57% for C-10, when 3a6 was assigned the mtDNA copy number value of 100% (Fig 3B). These values are characteristic of Rho-0 cell lines, as shown in the

Table 2. Summary of the most effective reagent reducing mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in 3a6 human mesenchymal stem cells (hMSCs).

Drug	Concentration	Time (Hours)	3a6% mtDNA copy number
Etidium bromide (EtBr)	100 mM	168	8.15
Rhodamine-6g (Rd6g)	3 µg/ml	120	84.97
1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)	25 µM	72	41.41
Zidovudine (AZT)	0.5 mM	216	221.55
Stavudine (d4t)	0.5 mM	144	2.86

doi:10.1371/journal.pone.0164199.t002

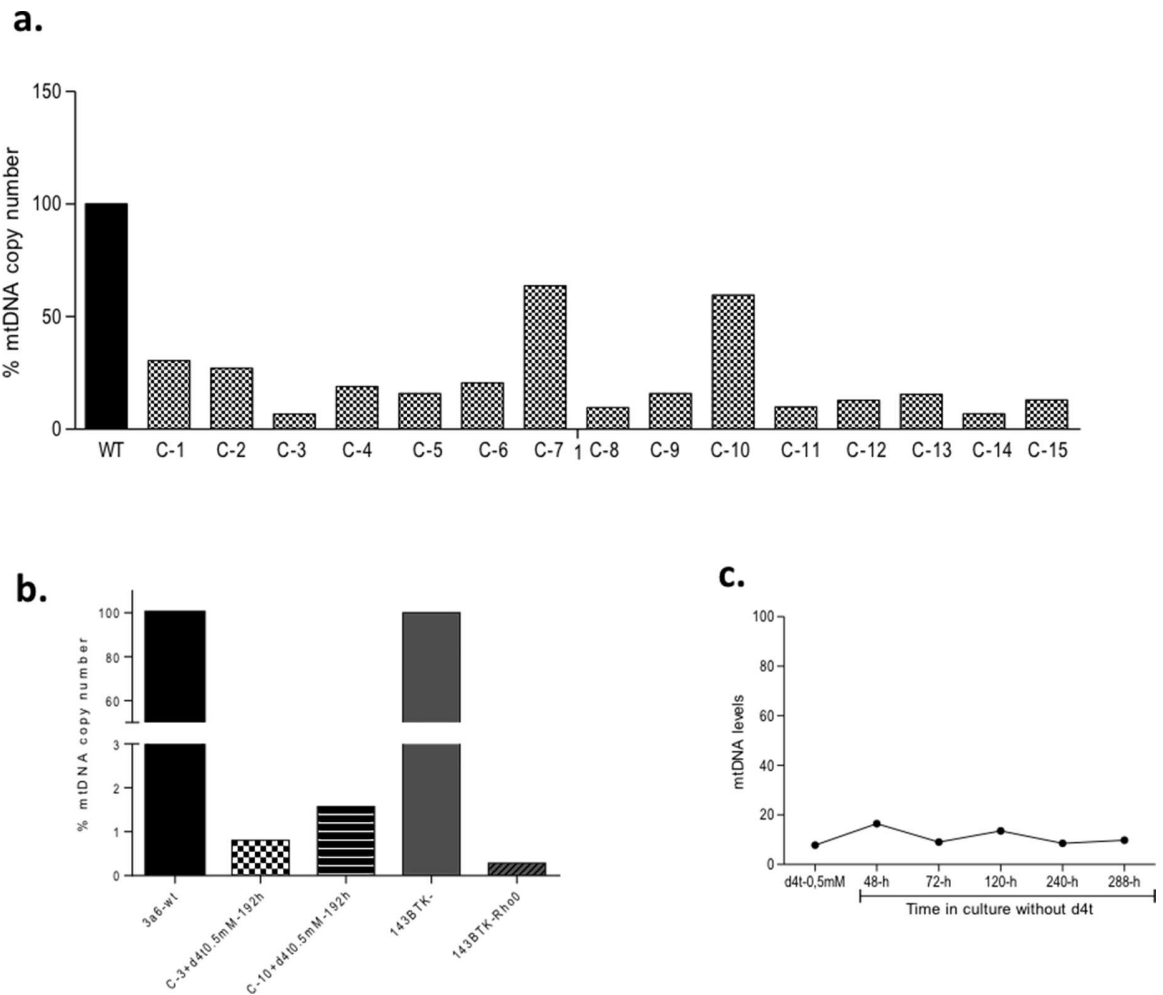


Fig 3. Clone Selection. (a). The mitochondrial DNA (mtDNA) copy number of 15 clones isolated by limit dilution from 3a6 cells treated with Stavudine (d4t) at 0.5 mM for 240 hours. Data for clones are expressed as percentages of untreated cells [without treatment (wt), value 100%]. (b). mtDNA copy number of two selected clones, one with low mtDNA (C-3; 1.57%) and the other with a high value for this parameter (C-10; 0.80%). Both clones were re-treated with d4t at 0.5 mM for 192 hours with mtDNA copy number expressed as a % of that of the 3a6 parental line. In this graphic, the %mtDNA copy number for 143B.TK- Rho-0 is also represented in relation to that of its parental cell line (143B.TK-). (c). This graph shows the % of mtDNA copy number for C-3 cultured in DMEM without d4t for 288 hours. The results show the stability of the mtDNA copy number during culture without the drug.

doi:10.1371/journal.pone.0164199.g003

same Fig where the % of mtDNA copy number in the 143B.TK-Rho-0 line (0.284%) is compared to that of its parental cell (143B.TK-) (100%).

To test the ability of the selected clones to grow in culture medium without d4t and maintain the mtDNA levels of a Rho-0 cell line, we cultured C-3 cells (pre-treated for 192 h with d4t at 0.5 mM) for 288 hours in a culture medium supplemented only with uridine. We then isolated the total DNA at 48, 72, 120, 240 and 288 hours of culture and assessed the mtDNA copy number. The results showed that these cells maintained low levels of mtDNA (Fig 3C). These results indicate that the clones isolated from 3a6 are Rho-0 cells and could be used to construct transmitochondrial cybrids. The C-3 clone was selected for use in further experiments.

Because all reagents do not possess the same capability for removing mtDNA in different cell lines, we examined the ability of these reagents in another hMSC cell line generated from

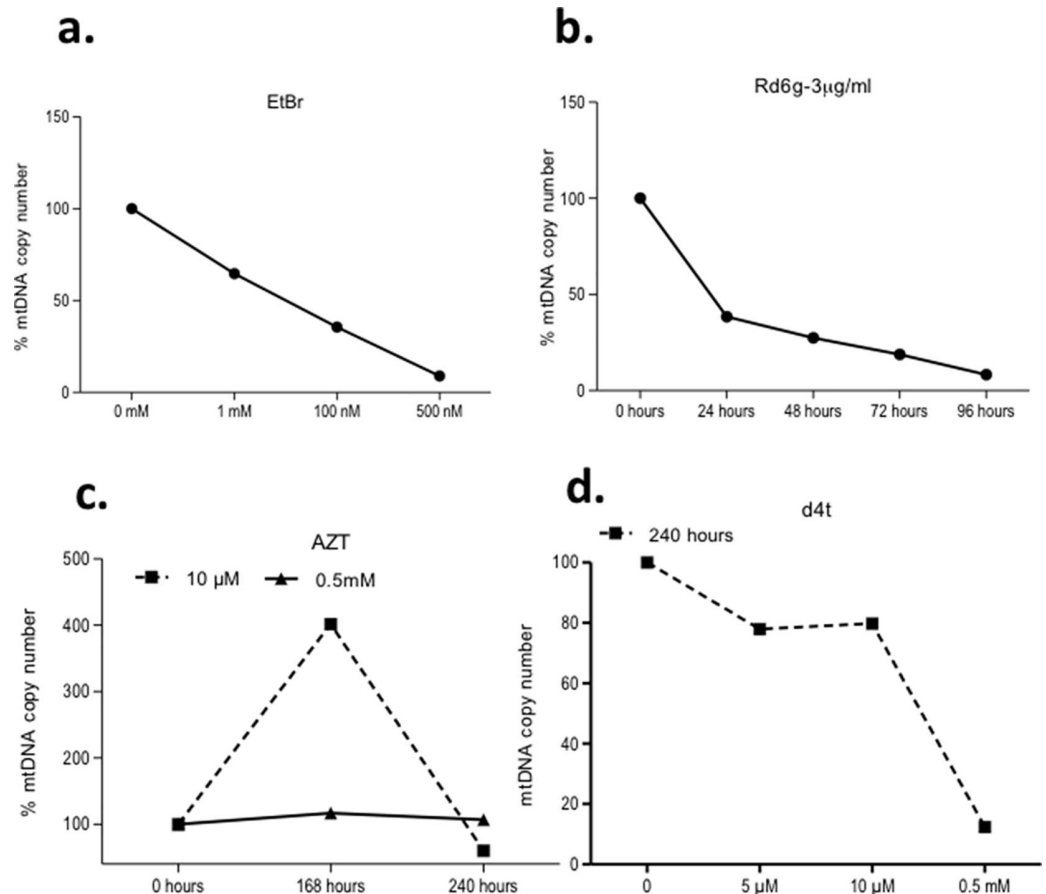


Fig 4. The response of the KP cell line to different substances that deplete mitochondrial DNA. All mtDNA copy numbers are expressed as percentages compared to those of untreated cells valued at 100%. (a). Treatment with ethidium bromide (EtBr) at three different concentrations, 1 mM, 500 nM and 100 nM, for 240 hours. (b). Treatment with Rhodamine6g (Rd6g) at 3 µg/ml for 24, 48, 72 and 96 hours; the positive response started at 48 hours. (c). Treatment with Zidovudine (AZT) at 10 µM and 0.5 mM for 168 and 240 hours. (d). Treatment with Stavudine (d4t) at three concentrations, 5 µM, 10 µM and 0.5 mM, for 240 hours. 8×10^4 cells were plated in each experiment for treatment with different agents. The figures represent at least two independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0164199.g004

the same cell line donor as 3a6. We used the KP cell line to evaluate the efficiency of the compounds tested on 3a6. We first determined the ability of KP cells to become Rho-0 cells. The results indicated that KP cells incubated with EtBr at 500 nM for 168 hours showed decreased levels of mtDNA copy number, 8.93%, compared to cells without treatment (KP control at 100%) (Fig 4A). Rd-6g (3 µg/ml) lowered the mtDNA content beginning on the second day of exposure, the level of mtDNA at 96 hours being 8.34% (Fig 4B). The capacity of NRTIs in KP cells was similar to that in 3a6 cells. Culture with AZT produced mtDNA levels above 100%, except for 10 µM at 240 hours, at which concentration and time mtDNA levels decreased to near 60% (Fig 4C). Three concentrations of d4t were tested (5 µM, 10 µM and 0.5 mM) over 240 hours of culture and mtDNA levels decreased to 12.38% at 0.5 mM concentration (Fig 4D). The most effective concentration and time of culture of the conditions tested to reduce mtDNA copy number in the KP mesenchymal stem cell line are summarized in Table 3.

Table 3. Summary of the most effective reagent, in KP human mesenchymal stem cells (hMSCs).

Drug	Concentration	Time (Hours)	KP % mtDNA copy number
Etidium bromide (EtBr)	500 mM	168	8.93
Rhodamine-6g (Rd6g)	3 µg/ml	96	8.34
Zidovudine (AZT)	10 µM	240	59.68
Stavudine (d4t)	0.5 mM	240	12.38

doi:10.1371/journal.pone.0164199.t003

Characterization of Rho-0 hMSC cells

To assess whether 3a6 Rho-0-like cells maintain the stem properties of 3a6-wt cells, a phenotypic characterization was developed. FACS analysis demonstrated that 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells showed a similar cell-surface receptor pattern (Fig 5A). Both types of cells were negative for CD34, CD45, CD69, CD106, CD271 and STRO antigens (data not shown). In both 3a6-wt and 3a6 Rho-0-like cells nearly 95% of the cells were positive for CD29, CD73, and CD90. Significant differences existed for CD105 (3a6-wt: 51.96±16.07%; 3a6 Rho-0-like: 17.99±1.80%, $p < 0.05$) and SSEA4 (3a6-wt: 20.45±3.52%; 3a6 Rho-0-like: 79.01±3.92%, $p < 0.0001$).

The assessment of ROS production showed no significant differences between 3a6-wt, 3a6 Rho-0 and 143B.TK- Rho-0 cells (Fig 5B). While levels of apoptosis did not differ in numbers of positive cells between basal conditions and Staurosporine exposure in 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells, for 143B.TK- Rho-0 cells the difference was statistically significant (basal: 10.11±2.67; Staurosporine 32.20±7.36, $p < 0.05$) (Fig 5C).

The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) of 3a6 Rho-0 cells showed a significant decrease compared to that of 3a6-wt cells (3a6-wt: 95.66±1.86%; 3a6 Rho-0: 68.11±1.62%; $p \leq 0.05$). Similarly, the $\Delta\psi_m$ of the 143B TK- Rho-0 cell line significantly decreased compared to that of 3a6-wt cells (3a6-wt: 95.66±1.86%; 143B TK- Rho-0: 68.50±5.37%; $p \leq 0.001$) (Fig 5D).

The mitochondrial network was broken in the 3a6 Rho-0 cells and mitochondria were rounded and surrounded the nucleus when compared with 3a6-wt cells (Fig 5E). The 3a6 Rho-0 cells had a lower basal OCR and did not respond to the administration of oligomycin, FCCP and rotenone/antimycin while parental cells showed standard values. These results are similar to those found for 143B.TK- and 143B.TK-Rho-0 cells (Fig 5F and 5G).

Differentiation capacity of Rho-0 hMSCs

To evaluate the multipotential capacity of Rho-0 hMSCs, we examined the expression of Nano-Homeobox (Nano-g), POU Class 5 Homeobox 1 (Oct 3/4), SRY (Sex determining region)-Y-box 2 (Sox-2) and SRY-box 9 (Sox-9). The results of the q-PCR analyses revealed that the expression levels of the four genes in 3a6-Rho-0 cells were significantly lower than those in 3a6-wt cells ($p \leq 0.05$) (Fig 6A).

Another set of experiments was designed to study how reducing the expression of the above mentioned four genes affects the capacity of 3a6 Rho-0 cells to differentiate into osteocytic, adipocytic and chondrocytic cellular lineages.

Basal expressions of two genes involved in osteogenesis, alkaline phosphatase-4 (ALP) and osteocalcin-1 (OC-1), did not show any significant difference between 3a6 Rho-0 and 3a6-wt cells (Fig 6B). However, their expression after 9 days in culture with specific differentiation medium showed that ALP expression was higher in 3a6 Rho-0 than 3a6-wt cells (0.575 ±0.035-fold for 3a6-wt and 1.701±0.156-fold for 3a6 Rho-0). Expression levels of OC-1 after osteogenesis induction did not show significant differences between the two cell types (Fig 6C).

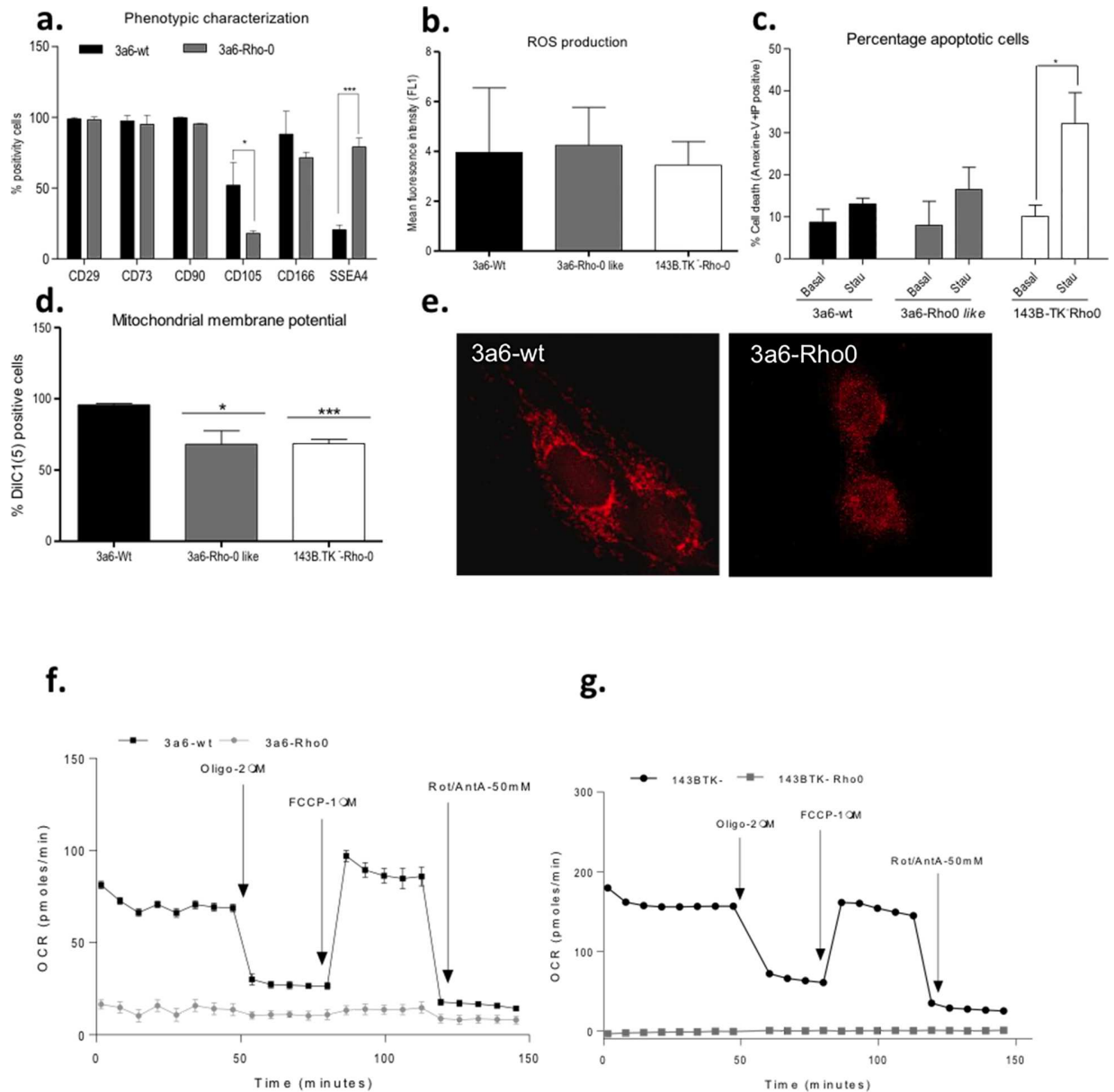


Fig 5. Characterization of 3a6 cells without treatment (3a6-wt) and 3a6 Rho-0 like cells. (a). Phenotypic characterization is represented as the percentage of positivity for CD29, CD73, CD90, CD105, CD166 and SSEA4 for both cell types. (b). Cellular levels of reactive oxygen species (ROS) in both cell types and in 143B.TK-Rho-0 cells (used as a reference for a typical Rho-0 line). Total ROS production was measured with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA); data are expressed as mean fluorescence intensity. (c). Apoptosis measured with Annexin-V-FIT: data are expressed as percentage of positive cells for Annexin-V and propidium iodide (PI) in basal conditions and culture in presence of Staurosporine (Stau) at 2 μ M for 2 hours. (d). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m) measured with DiIC1(5) [1,1',3,3,3'-hexamethylindodicarbonyl cyanine iodide], data are expressed as percentages of cells that were positive for DiIC1(5) fluorescence. (e). Mitochondrial network in 3a6-wt and 3a6-Rho 0 cells incubated with 250 nM MitoTracker Red solution for 30 min in a 37°C incubator. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde and counterstained with Hoechst-33258 nuclear dye. The cells were photographed with a confocal microscope Nikon AR-1. (f-g) The mitochondrial respiration [oxygen consumption (OCR)] pattern was obtained using a SeaHorse XFP for 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells (f) and for 143B.TK- and 143B.TK-Rho-0 cells (g). All data were obtained from three independent experiments, expressed as mean \pm SD and analyzed by the unpaired t-test (*, $p \leq 0.05$; *** $p < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0164199.g005

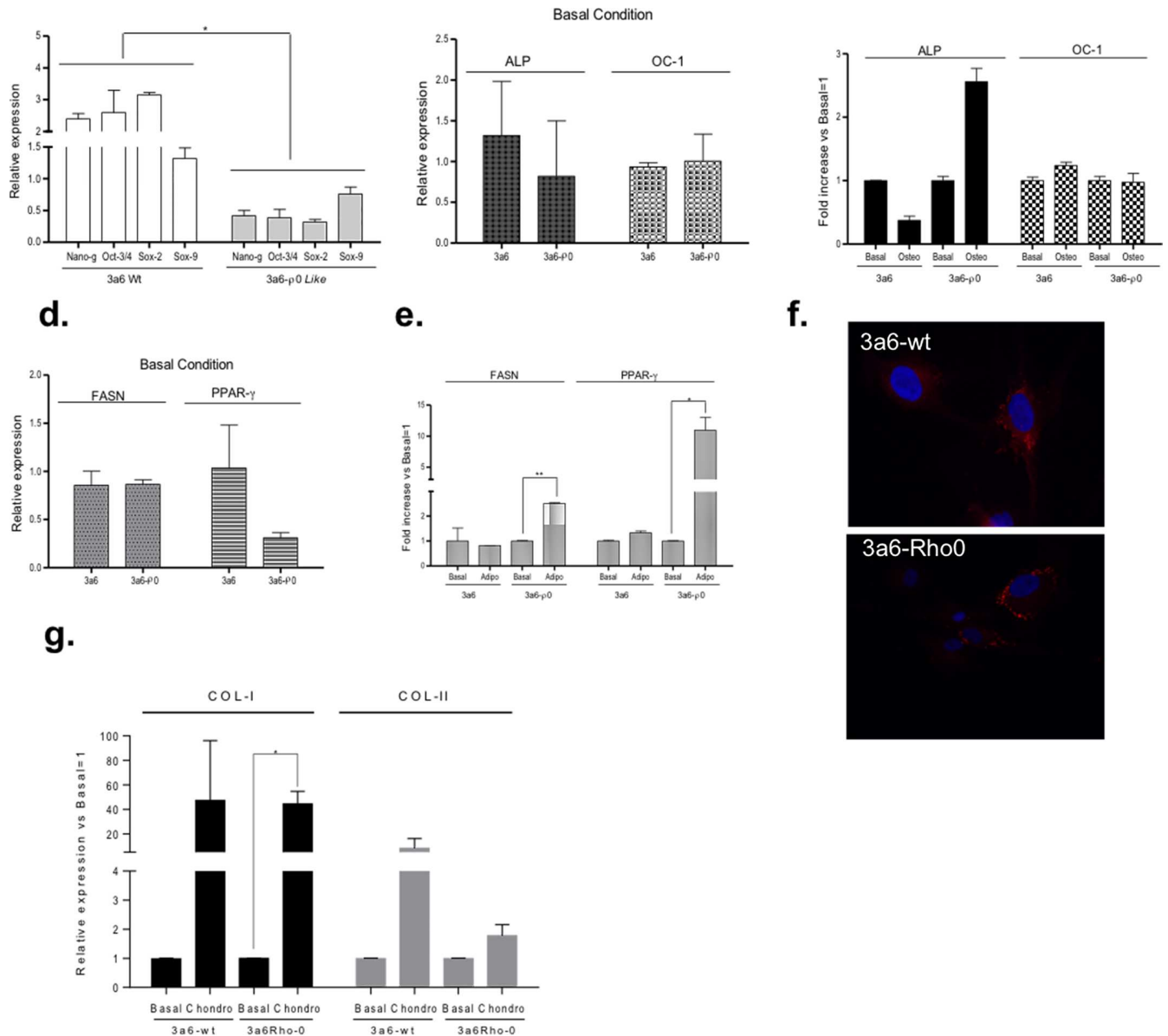


Fig 6. Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation in 3a6 without treatment (3a6-wt) and 3a6 Rho-0 cells. (a) Gene expressions implicated in the non-differentiation stage: Nano-HomeoBox (Nano-g), POU Class 5 Homeobox 1 (Oct 3/4) and SRY (Sex determining region)-Y-box 2 (Sox-2) and SRY (Sex determining region)-Y-box 9 (Sox-9) in 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells. (b) Gene expressions implicated in the osteogenic process: alkaline phosphatase-4 (ALP) and osteocalcin-1 (OC-1) in basal condition in 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells. (c) Fold increase in the gene levels of ALP and OC-1 during osteogenic induction for 9 days; data are expressed relative to the basal condition (basal condition equal to 1). (d) Basal gene expressions implicated in the adipogenic process: fatty acid synthase (FASN) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-γ) in 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells. (e) Fold increase in the gene levels of FASN and PPAR-γ following 9 days under adipogenic differentiation; data are expressed relative to the basal condition (basal condition equal to 1). (f) LD540, which stains lipid droplets, was used to measure adipogenic differentiation in 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells. Cells were cultured in standard medium (control) and in adipogenic medium for 9 days. Cells were fixed and double-stained with LD540 (red) for lipid droplets and Hoechst 33258 (blue) for DNA. Fluorescence was visualized with Olympus BX61 fluorescence microscopy and photographed at 20X. (g) Fold increase in the gene levels of CoL-I and CoL-II in the micropellet model following 21 days under chondrogenic differentiation; data are expressed relative to the basal condition (basal condition equal to 1). All data were obtained from three independent experiments, expressed as mean ±SD and analyzed by the unpaired t-test (*, p≤0.05; ** p<0.005). Basal, without induction. Osteo (Osteogenic), Adipo (Adipogenic), Chondro (Chondrogenic) cells grown in the presence of indicated medium.

doi:10.1371/journal.pone.0164199.g006

Basal expression of the fatty acid synthase (FASN) gene was similar in both 3a6-wt and 3a6-Rho-0 cells. The basal expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) was higher in 3a6-wt than 3a6 Rho-0 cells, but not significantly so (Fig 6D). Interestingly, in 3a6-wt cells, the induction of adipogenesis differentiation did not modify the expressions of FASN and PPAR- γ (0.558 ± 0.13 -fold for FASN and 0.522 ± 0.113 -fold for PPAR- γ). However, differentiated 3a6 Rho-0 cells showed a significant increase in the levels of both genes (FASN: 2.45 ± 0.14 -fold, $p\leq 0.005$; PPAR- γ : 9.334 ± 1.32 -fold, $p\leq 0.01$) (Fig 6E). These results were confirmed by staining cells with LD540; cells cultured in adipogenic medium showed more neutral lipid in 3a6 Rho-0 cells than in 3a6-wt cells (Fig 6F).

To analyze the capacity of these cells to differentiate into chondrocytes, micropellet formation under chondrogenic differentiation was employed and the gene expression levels of CoL-I and CoL-II were evaluated. The results showed that chondrogenic differentiation increased the levels of CoL-1, but with statistical significance only in the case of 3a6 Rho-0 cells (44.38 ± 10.28 , $p\leq 0.05$). The levels of CoL-II increased more in 3a6-wt than in 3a6 Rho-0 cells (Fig 6G).

To examine the extent of mitochondrial activity involvement in the cellular differentiation process, the expression levels of two genes indicative of mitochondrial biogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha (PGC-1 α) and transcription factor A mitochondrial (TFAM) were determined. The basal expression level of both genes was similar in 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells, but the basal genetic expression of PGC-1 α was significantly higher in 3a6-wt than in 3a6 Rho-0 cells ($p<0.01$) (Fig 7A).

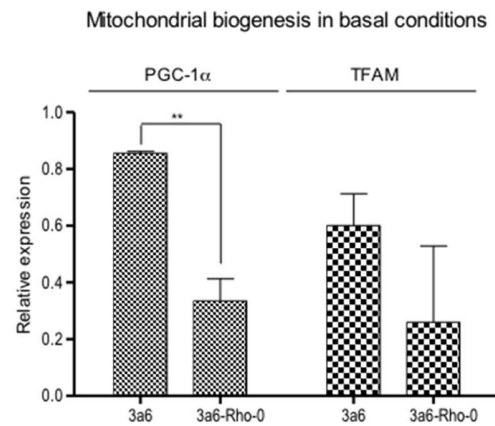
The gene expression level of PGC-1 α after 9 days in culture with specific adipogenic medium in comparison with cells cultured in basal medium showed that its expression was significantly higher in 3a6 Rho-0 adipogenic than in basal condition (3a6 Rho-0-Adipo: 10.82 ± 1.082 -fold vs. 3a6 Rho-0-Basal $p\leq 0.005$) (Fig 7B). Similar results (but not significant) were obtained for TFAM gene expression (Fig 7C).

Discussion

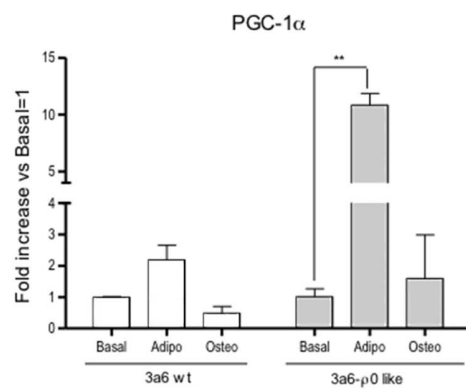
The first successful isolation of human Rho-0 cells used long-term exposure to EtBr of cells from the 143B.TK- cell line [16]. These authors found that growth of cells obtained by this method is uridine- and pyruvate-dependent because of the absence of a functional respiratory chain. To date, most Rho-0 cells used to construct cybrids have been generated following this procedure. We have, in this work, used EtBr to evaluate the capacity of cells of a hMSC line to become Rho-0 cells and survive. Our results confirm the capability of EtBr to deplete mtDNA in hMSCs and, furthermore, the ability of these depleted cells to survive with very low copies of mtDNA in culture containing uridine. However, EtBr is an intercalating agent that causes negative effects in the nuclear genome; therefore, we consequently analyzed other compounds with the aim of reducing the number of mtDNA copies with less toxicity. We examined the karyotype of these depleted cells and have shown that the compounds used to produce 3a6 Rho-0 cells do not induce change in the number and in the size of chromosomes. Both 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cell types have similar chromosome conformation and their karyotypes are similar (data are not presented).

The first compound tested was Rhodamine 6g (Rd6g), which, in vivo penetrates into the cell and binds to the inner membranes of the mitochondria, decreasing mitochondrial enzymatic activity. This inhibits oxidative phosphorylation and reduces the number of intact and metabolically active mitochondria within the cell [24]. Rd6g has been used to remove mitochondrial DNA from cells in culture for the construction of cybrids or hybrids using hamster [36], mouse [37] and human skin fibroblasts [38]. Our results showed that Rd6g is less effective for

a.



b.



c.

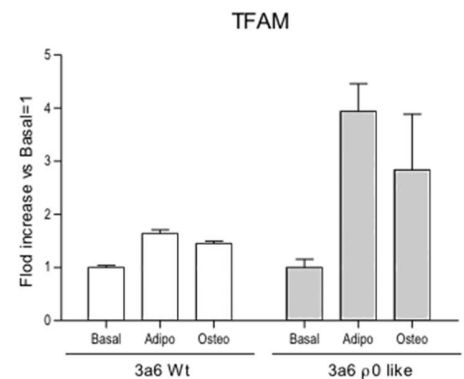


Fig 7. mRNA expression of mitochondrial biogenesis genes in 3a6 without treatment (3a6-wt) and 3a6 Rho-0 cells. (a) To analyze mitochondrial biogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) and transcription factor A, mitochondrial (TFAM) gene expression levels were determined under basal conditions. (b) Fold increase of PGC-1 α gene levels during osteogenic and adipogenic induction. and (c) TFAM gene levels during osteogenic and adipogenic induction. Data are expressed relative to basal condition (basal condition equal to 1). All data were obtained from two independent experiments, expressed as mean \pm SD and analyzed by the unpaired t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$). Basal, in standard medium, Adipo (Adipogenic) and Osteo (Osteogenic); all experiments were developed during 9 days in each specific differentiation culture medium.

doi:10.1371/journal.pone.0164199.g007

removing mtDNA in hMSC cell lines, although in KP cells Rd6g produced a larger decrease of mtDNA copy number, but this reduction was not sufficient to generate Rho-0 cells. It is possible that Rd6g causes rapid and irreversible damage to mitochondria without removing mtDNA [38,39].

Another compound tested to reduce mtDNA from 3a6 hMSCs was MPP⁺. This molecule inhibits mtDNA replication by preventing incorporation of 5-bromo-20-deoxyuridine into mitochondrial, but not into nuclear DNA [27,29]. Data generated by several studies suggested that MPP⁺ does not affect the overall biogenesis of mitochondria because mitochondrial transcription factor A is not decreased in treated cells. Thus, MPP⁺ selectively inhibits the replication of mtDNA, decreasing the intracellular content of mtDNA in treated cell lines [27,29,40,41]. In our work, 3a6 hMSCs could survive in the presence of MPP⁺ for only a short time. The results of the effect of MPP⁺ described in the literature demonstrated that MPP⁺

initiated lipid peroxidation, stimulated ROS production and decreased ATP levels, all processes implicated in the cell death induced by this compound [27] and indicating potent cellular toxicity in hMSCs.

The other two compounds tested (AZT and d4t) are NRTIs, a group of drugs used in the treatment of AIDS associated with lipodystrophy. The prevailing hypothesis for their toxicity suggests that these drugs inhibit mtDNA polymerase γ [26,42]. AZT inhibits thymidine phosphorylation and may deplete intracellular thymidine-5'-triphosphate (TTP) to generate an imbalance between TTP and other deoxynucleotides [43–46]. In our study with hMSCs, AZT increased mtDNA content in both 3a6 and KP cell lines, in agreement with results obtained by other authors [43,47]. Although the mechanisms through which AZT increased mtDNA are unknown, some studies have indicated that this compound up-regulates genes encoding mtDNA [48]. Other authors have suggested that the mechanism is a compensatory response to mitochondrial dysfunction, which includes inhibition of mtDNA polymerase γ [47], oxidative stress [49] and increased mitochondrial mass because of oxidative stress [50,51]. Another NRTI thymidine analogue, potentially much more toxic to polymerase γ [42,52], is Stavudine (d4t). Our results are in agreement with previous reports [43,53] that d4t induced significant reduction of the mtDNA copy number in both hMSC cell lines analyzed compared to cells without treatment. The mitochondrial copy number in 3a6 cells treated with d4t (3a6 Rho-0: 8.3 ± 3.01) is in a similar range of values obtained with 143B.TK-Rho-0 cells (4.11 ± 1.97); both values were calculated using the previously described methods. In addition, the low copy number of mtDNA was maintained for 288 hours after removing d4t from the hMSC culture. These data support the stability of the low number of mtDNA copies even in the absence of drug. The mitochondrial network was broken when 3a6 cells became 3a6 Rho-0 cells. The mitochondrial morphology changed and the mtDNA depletion induced mitochondrial fragmentation like that described in other Rho-0 cell lines generated by other methods [54,55]. The data obtained on mitochondrial respiration indicated that the 3a6 Rho-0 cells generated in this work have greatly impaired respiration, like that of a typical Rho-0 cell line [54,55]. All these characteristics indicate that hMSCs cultured with d4t are really Rho-0 cells.

Because the results confirm that 3a6 hMSCs can become 3a6 Rho-0 cells, it was necessary to show that these cells continue being MSCs. To confirm the MSC phenotype, cell surface receptor patterns were studied in both 3a6-wt and 3a6 Rho-0. The results showed a similar receptor pattern for four receptors in both cell types, but 3a6 Rho-0 had a lower percentage of CD105. However, this value agrees with the value for this receptor in the parental cell line (3a6) [33] and in the original cell line from which the KP cell line was obtained, which had levels of CD105 less than 20% [32]. In addition, 3a6 Rho-0 showed high levels of SSEA. Taken together, these findings suggest that hMSC Rho-0 cells still express the characteristic MSC phenotype pattern.

ROS production was assessed using flow cytometry with the results showing the same level of ROS for both 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells. These data differ from previous studies reporting that Rho cell lines and their parental cell lines produce different levels of ROS [56,57]. However, the ROS level of 3a6 Rho-0 cells is very similar to the ROS level of classical Rho-0 cells (143B.TK-Rho-0). It is possible that the capacity of 3a6 hMSCs to produce ROS is lower than the differentiated cell lines used in other studies [56].

Survival and the percentage of apoptosis in both 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cell lines were similar. 3a6 Rho-0 cell growth was dependent on uridine as shown previously in other Rho-0 cell lines. The percentage of apoptotic cells with uridine exposure showed a normal number of apoptotic cells. The induction of apoptosis with staurosporine was also similar for both cell types. These data indicate that the generated cells have normal viability in culture and are suitable for study of the role of mitochondria in apoptosis.

The lower mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) of 3a6 Rho-0 cells compared to 3a6-wt cells agrees with the results from another Rho-0 cell line when compared with parental cells. For example, 143B.TK-Rho-0 had 36% less $\Delta\psi_m$ than 143B.TK-. However, the $\Delta\psi_m$ of other Rho-0 lines (HepG2 and HeLaS3), did not reflect differences from their parental cells [58]. Several authors have shown that Rho-0 cell lines maintain the $\Delta\psi_m$ because it is necessary for growth [59] and that the $\Delta\psi_m$ is maintained by a residual proton gradient [60–62]. Assuming that the mitochondrial electron transport chain (ETC) is the major source of intracellular ROS, the results indicated that the ETC works well in cells that had been depleted of their mtDNA, in line with the results obtained by $\Delta\psi_m$.

The methodologies described in this work were tested in hMSCs from primary bone marrow and synovial tissue cultures. Analyses of Rd6g and d4t efficiency in hMSCs from primary cultures revealed differences in efficiency depending on the patient (data not shown). However, the most important limitation of using hMSCs from primary culture was their limited ability for expansion under standard conditions, especially with increasing age of the patient [28,29] and rapid senescence in culture [30,31].

The protocols described here allowed us to generate Rho-0 cells from hMSCs avoiding some typical inconveniences from using tumour cells, such as aneuploidy. This characteristic varies extensively among different Rho-0 cell lines [18–20] and, to date, it is not clear how aneuploidy impacts mitochondrial function. In addition, we tested several compounds and protocols to avoid using EtBr, a compound with very important toxic effects on population health. Among the compounds and conditions tested in this work, we suggest that d4t exposure at 0.5 mM for 240 hours is the best protocol to generate Rho-0 cells from 3a6 and KP hMSCs (Tables 2 and 3).

We also evaluated the effect of depletion of mtDNA on stem cell-like properties. Our data suggest a decrease of stem-like potentiality during mtDNA depletion. Some researchers have shown a relationship between mtDNA and the level of DNA methylation [63–65]. Recent evidence using a global assessment of DNA methylation found that cells depleted in mtDNA showed altered DNA methylation of the nuclear genome [64]. This finding may help explain our finding differences in the expression of several genes involved in MSC differentiation from 3a6-wt to 3a6 Rho-0, but additional work will be needed to confirm this.

Core pluripotency, including Nanog, Oct-4 and Sox-2, share points of convergence with STAT3, a master metabolic regulator controlling the oxidative glycolytic switch [66–69]. 3a6 Rho-0 cells have a lower expression of these genes than 3a6-wt cells. Taking into account that the transition from glycolysis to mitochondrial oxidative metabolism and maintenance of mitochondrial electron transport function are critical for differentiation [64,68], perhaps 3a6 cells will have more difficulty to respond under mesenchymal induction.

hMSCs are somatic stem cells with the capacity to differentiate into multiple lineages, including osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. In this work we evaluated whether the mtDNA-depleted 3a6 Rho-0 cell line could differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. The results indicated that both 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cell lines could be induced to differentiate under defined culture conditions, but the capacity for response was different. Osteogenic and chondrogenic differentiation was more effective in 3a6-wt than in 3a6 Rho-0 cells, while adipogenesis was more effective in 3a6 Rho-0 cells. A possible explanation could be that metabolic changes in hMSCs may differ drastically depending on which lineage they are induced to differentiate [70]. The genetic expression levels analyzed were low, probably due to the short induction time, although 9 days was described in the literature as an optimal time for evaluating the differentiation process in hMSCs. The expression of the OP gene was detected 14 days after induction, while PPAR- γ was detected 7 days after induction in the KP cell line [32]. OC expression was positive in 3a6 cells after 14 days in osteogenic medium [33]. We

followed the differentiation for 9 days to analyze the differentiation capacity of 3a6 Rho-0 cells compared to 3a6 cells. Perhaps an in-depth analysis of the differentiation process under longer differentiation time would be interesting.

The different values for CD105 between 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells might reflect a different chondrogenic capacity of both cell types, as recently described by Fan and coworkers, who found that CD105 promotes chondrogenesis in MSCs obtained from synovium [71]. This data opens several new areas for research.

Several authors have described that during hMSC osteogenic and adipogenic differentiation there is a well coordinated process involving up-regulation of the biogenesis and respiratory function of mitochondria and expression of antioxidant enzymes. [66,67,72]. Mitochondrial biogenesis has been shown to be essential for adipogenic differentiation of the 3T3 mouse embryonic fibroblast cell line [73]. Knowing the metabolic switch during hMSC differentiation is dependent on increased mitochondrial activity, the analyses of PGC1 α , a key for mitochondrial biogenesis, and TFAM, a transcription factor that binds to the mitochondrial genome, increasing their replication and mitochondrial gene expression in differentiation processes, were performed in 3a6-wt and 3a6 Rho-0 cells. PGC1 α and TFAM gene expressions were increased during the differentiation process, and this increase was higher in 3a6 Rho-0 cells under adipogenic induction. This suggests that, during differentiation, an increase in mitochondrial mass could result from increased biogenesis being more significant in cells with low levels of mtDNA copy number.

This data is in line with that of other groups, who showed that when the mtDNA copy number was analyzed during differentiation, a dynamic change upon induction occurred. One explanation for this could be that down-regulation of glycolysis genes and activation of respiratory genes by PGC-1 α increased the mtDNA [69,72]. The results shown here conformed to the idea that the mitochondria and bioenergetic functions play an important role in stem cells and in their differentiation process.

In summary, this is the first study to describe a protocol for the generation of Rho-0 cells using immortalized hMSCs and alternative compounds to EtBr. Because the generation of Rho-0 cells is the first step to construct cybrids, we suggest the use of hMSCs as nuclear donors. This model will allow study of the role of mitochondria as well as the different mtDNA haplogroups (or mtDNA SNPs) in the differentiation process. In addition, it will be possible to analyze the role of mitochondrial SNPs in specific cells obtained from hMSC differentiation. Several studies have shown that hMSCs are dependent on glycolysis for energy supply, but quickly shift to aerobic metabolism once they are induced to undergo differentiation. To our knowledge no one has published results like ours analyzing the mitochondrial role during the differentiation process.

Supporting Information

S1 File. Table A: List of cell used in this work. Table B: Primer using in qRT-PCR. Primers sequence using in the expression levels experiments with the corresponding Roche number probe. The gene name and the pathway that each of them is implicated are represented. (DOCX)

Author Contributions

Conceptualization: FJB RG MFM.

Formal analysis: IRP ADF MFM.

Funding acquisition: IRP FJB.

Investigation: THG MEG ADF MFM.

Methodology: THG MEG ADF MFM.

Project administration: FJB.

Supervision: RG FJB.

Writing – original draft: MFM MEG RG FJB.

Writing – review & editing: FJB MFM.

References

- De Vivo DC. 1993. The expanding clinical spectrum of mitochondrial diseases. *Brain Dev.* 15(1):1–22. PMID: [8338207](#)
- DiMauro S. and Schon E.A. 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med.* 348(26):2656–68. doi: [10.1056/NEJMra022567](#) PMID: [12826641](#)
- Pastore A., Petrillo S., Tozzi G., Carrozzo R., Martinelli D., Dionisi-Vici C, et al. 2013. Glutathione: a redox signature in monitoring EPI-743 therapy in children with mitochondrial encephalomyopathies. *Mol Genet Metab.* 109(2): 208–214. doi: [10.1016/j.ymgme.2013.03.011](#) PMID: [23583222](#)
- Leng Y., Liu Y., Fang X., Li Y., Yu L., Yuan Y. et al. 2015. The mitochondrial DNA 10197 G>A mutation causes MELAS/Leigh overlap syndrome presenting with acute auditory agnosia. *Mitochondrial DNA.* 26(2): 208–212. doi: [10.3109/19401736.2014.905860](#) PMID: [24708134](#)
- Petros J.A., Baumann A.K., Ruiz-Pesini E., Amin M.B., Sun C.Q., Hall J. et al. 2005. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 102(3): 719–724. doi: [10.1073/pnas.0408894102](#) PMID: [15647368](#)
- Ma Y., Bai R.K., Trieu R. and Wong L.J. 2010. Mitochondrial dysfunction in human breast cancer cells and their transmitochondrial cybrids. *Biochim Biophys Acta.* 1797(1): 29–37. doi: [10.1016/j.bbabi.2009.07.008](#) PMID: [19647716](#)
- Gallardo M.E., García-Pavía P., Chamorro R., Vázquez M.E., Gómez-Bueno M., Millán I. et al. 2012. Mitochondrial haplogroups associated with end-stage heart failure and coronary allograft vasculopathy in heart transplant patients. *Eur Heart J.* 33(3):346–53. doi: [10.1093/eurheartj/ehr280](#) PMID: [21821846](#)
- Fernández-Caggiano M., Barallobre-Barreiro J., Rego-Pérez I., Crespo-Leiro M.G., Paniagua M.J., Grillé Z. et al. 2013. Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population. *Mitochondrion.* 13(4):263–8. doi: [10.1016/j.mito.2013.03.005](#) PMID: [23528301](#)
- Govindaraj P., Khan N.A., Rani B., Rani D.S., Selvaraj P., Jyothi V. et al. 2014. Mitochondrial DNA variations associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Mitochondrion.* 16:65–72. doi: [10.1016/j.mito.2013.10.006](#) PMID: [24215792](#)
- Grazina M., Pratas J., Silva F., Oliveira S., Santana I. and Oliveira C. 2006. Genetic basis of Alzheimer's dementia: role of mtDNA mutations. *Genes Brain Behav.* 5(S2): 92–107.
- Acevedo-Torres K., Berríos L., Rosario N., Dufault V., Skatchkov S., Eaton M.J. et al. 2009. Mitochondrial DNA damage is a hallmark of chemically induced and the R6/2 transgenic model of Huntington's disease. *DNA Repair (Amst)* 8(1):126–36.
- Rego-Pérez I., Fernández-Moreno M., Fernández-López C., Arenas J. and Blanco F.J. 2008. Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 58(8): 2387–2396. doi: [10.1002/art.23659](#) PMID: [18668590](#)
- Fernández-Moreno M., Soto-Hermida A., Pertega S., Oreiro N., Fernandez-Lopez C. et al. 2011. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and serum levels of anti-oxidant enzymes in patients with osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 12:264. doi: [10.1186/1471-2474-12-264](#) PMID: [22108257](#)
- Fernández-Moreno M., Soto-Hermida A., Oreiro N., Pérttega S., Fernández-López C., Rego-Pérez I. et al. 2012. Mitochondrial haplogroups define two phenotypes of osteoarthritis. *Front Physiol.* 3:129. doi: [10.3389/fphys.2012.00129](#) PMID: [22593743](#)
- Rego-Perez I., Fernandez-Moreno M., Soto-Hermida A., Fenandez-Lopez C., Oreiro N. and Blanco F. J. 2013. Mitochondrial genetics and osteoarthritis. *Front Biosci (Schol Ed)* 5: 360–368.




16. King M.P and Attardi G. 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246: 500–3. PMID: [2814477](#)
17. Kukat A., Kukat C., Brocher J., Schäfer I., Krohne G., Trounce I. A. et al. 2008. Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. *Nucleic Acids Res.* 36(7): 1–10
18. Andrews P.W., Damjanov I., Simon D., Banting G.S., Carlin C., Dracopoli N.C. et al. 1984. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2 Differentiation in vitro and in vivo. *Lab Investig* 50(2):147–162. PMID: [6694356](#)
19. Kim G.J., Park S.Y., Kim H., Chun Y.H. and Park S.H. 2002. Chromosomal aberrations in neuroblastoma cell lines identified by cross species color banding and chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* 129: 10–16.
20. Cohen N, Betts D.R., Rechavi G., Amariglio N. and Trakhtenbrot L. 2003. Clonal expansion and not cell interconversion is the basis for the neuroblast and non neuronal types of the SK-N-SH neuroblastoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 143:8–84.
21. Friedenstein A.J., Piatetzky-Shapiro I.I. and Petrakova K.V. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 16(3): 381–90. PMID: [5336210](#)
22. Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I. and Frolova G.P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 6(2): 230–47. PMID: [5654088](#)
23. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D. et al. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284(5411): 143–147. PMID: [10102814](#)
24. Gear A.R.L. 1974. Rhodamine 6g. A potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. *The journal of Biological Chemistry,* 249 (11): 3628–3637. PMID: [4275428](#)
25. Singer T.P. and Ramsay R.R. 1990. Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update. *FEBS Lett.* 274 (1–2): 1–8. PMID: [2253761](#)
26. Lewis W. and Dalakas M.C. 1995. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nat Med.* 1: 417–422 PMID: [7585087](#)
27. Miyako K., Kai Y., Irie T., Takeshige K. and Kang D. 1997. The content of intracellular Mitochondrial DNA is decreased by 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+). *J. Biol. Chem.* 272 (15): 9605–9608. PMID: [9092484](#)
28. Siegel G., Kluba T., Hermanutz-Klein U., Bieback K., Northoff H. and Schäfer R. 2013. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med.* 11:146. doi: [10.1186/1741-7015-11-146](#) PMID: [23758701](#)
29. Choudhery M.S., Badowski M., Muise A., Pierce J., and Harris D.T. 2014. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med.* 12:8. doi: [10.1186/1479-5876-12-8](#) PMID: [24397850](#)
30. Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D., Phinney D.G., Class R., and Prockop D.J. 1999. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 107(2): 275–81. PMID: [10583212](#)
31. Muraglia A., Cancedda R. and Quarto R. 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* 113 (Pt 7):1161–1166. PMID: [10704367](#)
32. Hung S.C., Yang D.M., Chang C.F., Lin R.J., Wang J.S., Low-ToneHo L. et al. 2004. Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes. *Int. J. Cancer.* 110(3): 313–319. doi: [10.1002/ijc.20126](#) PMID: [15095294](#)
33. Tsai C.C., Chen C.L., Liu H.C., Lee Y.T, Wang H. W., Hou L. T. et al. 2010. Overexpression of hTERT increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines. *J. Biomed. Sci,* 17(1):64.
34. Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M. and Yoo J.U. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell. Res.* 238(1): 265–72. doi: [10.1006/excr.1997.3858](#) PMID: [9457080](#)
35. Spandl J., White D.J., psychel J. and Thiele C. 2009. Live cell multicolor imagen of lipid droplets with a new dye, LD540. *Traffic.* 10: 1579–1584. doi: [10.1111/j.1600-0854.2009.00980.x](#) PMID: [19765264](#)
36. Ziegler M.L. and Davidson R.L. 1981. Elimination of mitochondrial elements and improved viability in hybrids cells. *Somat. Cell. Genet.* 7: 73–88. PMID: [7221838](#)
37. Trounce I. and Wallace D.C. 1996. Production of transmitochondrial mouse cell lines by cybrids rescue of Rhodamine-6G pre-treated L-cells. *Somat. Cell. Mol. Genet.,* 22: 81–85. PMID: [8643997](#)

38. Williams A.J., Murrell M., Brammah S., Minchenko J. and Christodoulou J. 1999. A novel system for assigning the mode of inheritance in mitochondrial disorders using cybrids and Rhodamine 6G. *Human Molecular Genetics*, 8 (9): 1691–1697. PMID: [10441332](#)
39. Cho Y.M., Kim J.H., Kim M., Park S.P., Koh S.H., Ahn H.S. et al. 2012. Mesenchymal Stem Cells Transfer Mitochondria to the Cells with Virtually No Mitochondrial Function but Not with Pathogenic mtDNA Mutations. *PLoS One*. 7 (3): 1–8.
40. Miyako K., Irine T., Muta T., Umeda S., Kai Y., Fujiwara T., Takeshige K. et al. 1999. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) selectively inhibits the replication of mitochondrial DNA. *Eur. J. Biochem*. 259: 412–418. PMID: [9914521](#)
41. Umeda S., Muta T., Ohsato T., Takamatsu Ch., Hamasaki N. and Kand D. 2000. The D-loop structure of human mtDNA is destabilized directly by 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+), a parkinsonism-causing toxin. *Eur. J. Biochem*. 267: 200–206. PMID: [10601867](#)
42. Martin J. L., Brown C.E., Matthews-Davis N. and Reardon J.E. 1994. Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and mitochondrial DNA synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 38(12): 2743–2749. PMID: [7695256](#)
43. Lynx M.D., LaClair D.D. and McKee E.E. 2009. Effects of Zidovudine and Stavudine on Mitochondrial DNA of Differentiating 3T3-F442a Cells Are Not Associated with Imbalanced Deoxynucleotide Pools. *Antimicrobial agent Chemotherapy*. 53 (3): 1252–1255.
44. Pontarin G., Ferraro P., Valentino M. L., Hirano M. L., Reichard P. and Bianchi V. 2006. Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J. Biol. Chem*. 281: 22720–22728. doi: [10.1074/jbc.M604498200](#) PMID: [16774911](#)
45. Song S., Wheeler L. J. and Mathews C. K. 2003. Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J. Biol.Chem*. 278: 43893–43896. doi: [10.1074/jbc.C300401200](#) PMID: [13679382](#)
46. Song S., Pursell Z. F., Copeland W. C., Longley M. J., Kunkel T.A. and Mathews C. K. 2005. DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 4990–4995. doi: [10.1073/pnas.0500253102](#) PMID: [15784738](#)
47. Lund K. C., Peterson L. L. and Wallace K. B. 2007. Absence of a universal mechanism of mitochondrial toxicity by nucleoside analogs. *Antimicrob.Agents Chemother*. 51: 2531–2539. doi: [10.1128/AAC.00039-07](#) PMID: [17470651](#)
48. Saitoh A., Haas R.H., Naviaux R.K., Salva N.G., Wong J.K. and Spector S.A. 2008. Impact of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors on Mitochondrial DNA and RNA in Human Skeletal Muscle Cells. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52 (8): 2825–2830. doi: [10.1128/AAC.00434-08](#) PMID: [18541728](#)
49. Komarov A. M., Hall J. M. and Weglicki W. B. 2004. Azidothymidine promotes free radical generation by activated macrophages and hydrogen peroxide-iron-mediated oxidation in a cell-free system. *Biochim. Biophys. Acta* 1688: 257–264. doi: [10.1016/j.bbadis.2003.12.012](#) PMID: [15062877](#)
50. Lee H. C., Yin P. H., Lu C. Y., Chi C. W., and Wei Y. H. 2000. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem. J*. 348: 425–432. PMID: [10816438](#)
51. Wei Y. H., Lee C.F., Lee H.C., Ma Y.S., Wang C.W., Lu C.Y. et al. 2001. Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4,977 BP-deleted mitochondrial DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 928: 97–112. PMID: [11795533](#)
52. Hoschele D. 2006. Cell culture models for the investigation of NRTI-induced mitochondrial toxicity. *Relevance for the prediction of clinical toxicity. Toxicol. In Vitro* 20: 535–546.
53. Stankov M.V., Lücke T., Das A.M., Schmidt R.E. and Behrens G.M. 2010. Mitochondrial DNA Depletion and Respiratory Chain Activity in Primary Human Subcutaneous Adipocytes Treated with Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother*. 54 (1): 280–287. doi: [10.1128/AAC.00914-09](#) PMID: [19805555](#)
54. Qian W and Houten B.V. 2010. Alterations in bioenergetics due to changes in mitochondrial DNA copy number. *Methods*. 51: 452–457 doi: [10.1016/j.ymeth.2010.03.006](#) PMID: [20347038](#)
55. Spadafora D., Kozhukhar N., Chouljenko V.N., Kousoulas K.G. and Alexeyev M.F. 2016. Methods for Efficient Elimination of Mitochondrial DNA from Cultured Cells. *Plos One*. 11(5): 1–18.
56. Hoffmann S., Spitkovsky D., Radicella J.P., Bernd-Epe B. and Wiesner R.J. 2004. Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 36 (6): 765–773. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.019](#) PMID: [14990355](#)

57. Schauen M., Spitzkovsky D., Schubert J., Fischer J.H., Hayashi J-I. et al. 2006. Respiratory Chain Deficiency Slows Down Cell-Cycle Progression Via Reduced ROS Generation and is Associated With a Reduction of p21CIP1/WAF1. *J. Cell Physiol.* 209: 103–112. doi: [10.1002/jcp.20711](https://doi.org/10.1002/jcp.20711) PMID: [16775840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16775840/)
58. Loiseau D., Chevrollier A., Douay O., Vavasseur F., Renier R. et al. 2002. Oxygen Consumption and Expression of the Adenine Nucleotide Translocator in Cells Lacking Mitochondrial DNA. *Experimental Cell Research* 278: 12–18. PMID: [12126953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12126953/)
59. Li K., Neuffer P. D. and Williams R. S. 1995. Nuclear responses to depletion of mitochondrial DNA in human cells. *Am. J. Physiol.* 269: 1265–1270.
60. Marusich M. F., Robinson B. H., Taanman J. W., Kim S. J., Schillace R., Smith J. L. et al. 1997. Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: A comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1362: 145–159. PMID: [9540845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9540845/)
61. Buchet K. and Godinot C. 1998. Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J. Biol. Chem.* 273: 22983–22989. PMID: [9722521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9722521/)
62. Appleby R. D., Porteous W. K., Hughes G., James A. M., Shannon D., Wei Y. H. et al. 1999. Quantitation and origin of the mitochondrial membrane potential in human cells lacking mitochondrial DNA. *Eur. J. Biochem.* 262: 108–116. PMID: [10231371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10231371/)
63. Pollack Y.; Kasir J.; Shemer R.; Metzger S. and Szyf M. 1984. Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.*; 12(12):4811–4824. PMID: [6330684](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6330684/)
64. Shock L.S.; Thakkar P.V.; Peterson E.J.; Moran R.G. and Taylor S.M. 2011. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 108(9): 3630–3635. doi: [10.1073/pnas.1012311108](https://doi.org/10.1073/pnas.1012311108) PMID: [21321201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21321201/)
65. Chinnery P.C; Elliott H.R; Hudson G; Samuels D.C., Caroline L. and Relton C. L. 2012. Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol*; 41(1): 177–187. doi: [10.1093/ije/dyr232](https://doi.org/10.1093/ije/dyr232) PMID: [22287136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22287136/)
66. Chen C.T., Hsu S.H. and Wei Y.H. 2008-a. Upregulation of mitochondrial function and antioxidant defense in the differentiation of stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1800(3): 257–63.
67. Chen C.T., Shih Y.R., Kuo T.K., Lee O.K. and Wei Y.H. 2008-b. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 26(4):960–8. doi: [10.1634/stemcells.2007-0509](https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0509) PMID: [18218821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18218821/)
68. Demaria M, Giorgi C, Lebedzinska M, Esposito G, D'Angeli L, Bartoli A. et al. 2010. A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumor transformation and STAT3 addiction. *Aging*. 2:823–842. doi: [10.18632/aging.100232](https://doi.org/10.18632/aging.100232) PMID: [21084727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21084727/)
69. Chen C.T., Hsu S.H. and Wei Y.H. 2012. Mitochondrial bioenergetic function and metabolic plasticity in stem cell differentiation and cellular reprogramming. *Biochim Biophys Acta*. 1820(5):571–6. doi: [10.1016/j.bbagen.2011.09.013](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.09.013) PMID: [21983491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21983491/)
70. Folmes C.D.; Dzeja P.; Nelson T. and Terzic A. 2012. Metabolic Plasticity in Stem Cell Homeostasis and Differentiation. *Cell Stem Cell*. 11(5): 596–606. doi: [10.1016/j.stem.2012.10.002](https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.002) PMID: [23122287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23122287/)
71. Fan W., Li J., Wang Y., Pan J., Li S., Zhu L. et al. 2016. CD105 promotes chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells through Smad2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 474(2):338–44. doi: [10.1016/j.bbrc.2016.04.101](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.101) PMID: [27107692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27107692/)
72. Zhang Y.; Marsboom G.; Toth P.T., and Rehman J. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Plos One*. 2013. 8(10): 1–12.
73. Wilson-Fritch L., Burkart A., Bell G., Mendelson K., Leszyk J., Nicoloso S. et al. 2003. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*. 23(3):185–194.

Article

Impaired Metabolic Flexibility in the Osteoarthritis Process: A Study on Transmitochondrial Cybrids

Andrea Dalmao-Fernández ^{1,†}, Jenny Lund ^{2,†} , Tamara Hermida-Gómez ¹,
María E Vazquez-Mosquera ¹, Ignacio Rego-Pérez ¹ , Francisco J. Blanco ^{1,*}  and
Mercedes Fernández-Moreno ^{1,3,*} 

¹ Grupo de Investigación en Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Agrupación estratégica CICA-INIBIC, Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas, Universidade da Coruña (UDC), 15006 A Coruña, Spain; andrea.dalmao.fernandez@sergas.es (A.D.-F.); Tamara.hermida.gomez@sergas.es (T.H.-G.); maria.eugenia.vazquez.mosquera@sergas.es (M.E.V.-M.); ignacio.rego.perez@sergas.es (I.R.-P.)

² Section for Pharmacology and Pharmaceutical Biosciences, Department of Pharmacy, University of Oslo, 0363 Oslo, Norway; jenny.lund@farmasi.uio.no

³ Centro de investigación biomédica en Red, Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), 28029 Madrid, Spain

* Correspondence: fblagar@sergas.es (F.J.B.); Mercedes.fernandez.moreno@sergas.es (M.F.-M.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 19 February 2020; Accepted: 25 March 2020; Published: 27 March 2020



Abstract: Osteoarthritis (OA) is the most frequent joint disease; however, the etiopathogenesis is still unclear. Chondrocytes rely primarily on glycolysis to meet cellular energy demand, but studies implicate impaired mitochondrial function in OA pathogenesis. The relationship between mitochondrial dysfunction and OA has been established. The aim of the study was to examine the differences in glucose and Fatty Acids (FA) metabolism, especially with regards to metabolic flexibility, in cybrids from healthy (N) or OA donors. Glucose and FA metabolism were studied using D-[¹⁴C(U)]glucose and [1-¹⁴C]oleic acid, respectively. There were no differences in glucose metabolism among the cybrids. Osteoarthritis cybrids had lower acid-soluble metabolites, reflecting incomplete FA β -oxidation but higher incorporation of oleic acid into triacylglycerol. Co-incubation with glucose and oleic acid showed that N but not OA cybrids increased their glucose metabolism. When treating with the mitochondrial inhibitor etomoxir, N cybrids still maintained higher glucose oxidation. Furthermore, OA cybrids had higher oxidative stress response. Combined, this indicated that N cybrids had higher metabolic flexibility than OA cybrids. Healthy donors maintained the glycolytic phenotype, whereas OA donors showed a preference towards oleic acid metabolism. Interestingly, the results indicated that cybrids from OA patients had mitochondrial impairments and reduced metabolic flexibility compared to N cybrids.

Keywords: osteoarthritis; transmitochondrial cybrids; energy metabolism; metabolic flexibility

1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most frequent joint disease, but the etiopathogenesis of OA is not entirely understood. It is a heterogeneous disorder where genetics as well as biomechanical, endocrine, and inflammatory effects may be involved in its origin [1]. With acceptance of the joint as an organ, the pathogenesis of OA has been viewed as a complex process that involves cartilage degradation, synovial inflammation, subchondral sclerosis, muscular atrophy, and ligament damage; all culminating in joint dysfunction [2,3]. Recently, OA has been considered an illness with a low-grade chronic inflammation

due to the synthesis and release of several cytokines and matrix metalloproteinases, leading to failure of the cartilage repair system and further exacerbation of the dysfunction [3,4].

The maintenance of energy homeostasis requires nutrient sensing, signaling, trafficking, storage, and oxidation, depending on substrate availability and energy demand [5]. Under stress, most cells adapt and are able to change their energy metabolism, either by increasing catabolic pathways when substrate availability is high or by increasing anabolic processes to respond to low nutrient intake [6]. The ability to respond and adapt to changes in metabolic demand has been described as metabolic flexibility [7,8]. This term is well described as a healthy characteristic in skeletal muscle [7,9]. Metabolic flexibility is associated with well-functioning mitochondria due to the fact of their role in the last steps of both glucose and FA metabolism [5]. Metabolic inflexibility implies mitochondrial dysfunction and, depending on substrate availability, impaired glucose or FA oxidation which further leads to nutrient accumulation [7,8].

During OA, it has been established a relationship between mitochondrial dysfunction and cellular damage due to the impairments in mitochondrial function and metabolic alterations, such as fragmented mitochondrial mass, increased production of reactive oxygen species (ROS) production, and apoptosis but lower ATP production, stress response mechanisms, and autophagy [10–15]. Several studies have suggested that free fatty acids (FFAs) may play an important role in OA development. In these studies, OA is associated with a high accumulation of lipids in cartilage [16,17]. Oleic, palmitic, and linoleic acid are the predominant FAs found in this tissue, accounting for approximately 85% of the total FA content [18]. Also, it has been established increased FA accumulation with progression of OA [18,19]. This ectopic FA accumulation likely leads to lipotoxicity and contributes to the cellular dysfunction [20]. Thus, the literature implies a relation between cartilage alterations and lipid metabolism [18,19].

Continent-specific mtDNA polymorphisms, known as mtDNA haplogroups, have been correlated by several OA population studies [21–24]. Some of these mtDNA polymorphisms modulate mitochondrial function that influence the behavior of the cell. Haplogroup J is biochemically different from haplogroup H, being the most efficient in terms of oxidative phosphorylation (OXPHOS) and lower ROS production. Therefore, it has been hypothesized that subjects with mtDNA haplogroup J confer protection in aging diseases such as OA [24,25]. Evidence suggests that mtDNA haplogroup J protects against knee and hip incidence and progression of OA [26]. Transmitochondrial cybrids are a useful in vitro model to study the effects of having varying mtDNA, as they have a uniform nuclear background [27]. They have been used in the study of a number of diseases where mitochondrial dysfunction is prominent, including Parkinson's disease [28], Alzheimer's disease [29], and Leber hereditary optic neuropathy [30]. Furthermore, several studies have successfully used cybrids to explore the role of mtDNA variation in disease pathogenesis by affecting processes such as mitochondrial proteostasis, ROS production, and mitochondrial dysfunction [31,32].

The purpose of the present work was to examine the glucose and FA metabolism, with particular focus on metabolic flexibility, in cybrids from healthy (N) or OA donors. Furthermore, the role of mtDNA haplogroups H and J was studied.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

Platelets from N and OA donors carrying mtDNA haplogroups H or J (N-H, N-J, OA-H, or OA-J) were obtained from samples belonging to the Sample Collection for the Research of Rheumatic Diseases, created by Blanco and registered in the Spanish National Biobank Registry, Section of Collections (Register Code C.0000424). Written informed consent was obtained from all subjects and approval was obtained from the local Ethics Committee of the Galician Health Administration (CEIC). All procedures were conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

2.2. Transmitochondrial Cybrids Preparation

Cybrids derived from the 143B.TK[−]Rho-0 cell line were established as described previously [27]. Haplogroup genotyping was used to verify that the mtDNA of the cybrids line was the same as in the donor platelets. The mtDNA haplogroups were assessed using established methods [26].

Transmitochondrial cybrids were kept in Dulbecco's modified Eagle's medium with 5.5 mM (low) glucose (Gibco, Grand Island, NY, USA) (from here on described as DMEM-glu). For experiments, cybrids were cultured in DMEM-glu, DMEM no glucose (Gibco) supplemented with 100 μM oleic acid (Sigma–Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (from here on described as DMEM-ole) or DMEM low glucose supplemented with 100 μM oleic acid (consequently described as DMEM-glu/ole). All media were further supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 μg/mL) (Gibco). The cells were incubated in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. At least two clones were obtained of each cybrid for each experiment.

2.3. Basal Glucose and Fatty Acid (FA) Metabolism

2.3.1. Substrate Oxidation Assay and Measurement of Acid-Soluble Metabolites (ASM)

To analyze glucose and FA metabolism, cybrids were cultured with 1×10^4 cells/well on 96 well CellBIND[®] microplates (Corning Life Sciences, Schiphol-Rijk, Netherlands) in DMEM-glu or DMEM-ole for 48 h. Thereafter, D-[¹⁴C(U)]glucose (0.5 μCi/mL, 200 μM) (PerkinElmer NEN[®], Boston, MA, USA) or [1-¹⁴C]oleic acid (0.5 μCi/mL, 100 μM) (PerkinElmer NEN[®]) were given during 4 h CO₂ trapping as described previously [33]. In brief, a 96 well UniFilter[®] microplate (PerkinElmer, Shelton, CT, USA), activated for the capture of CO₂ by addition of 1 M NaOH, was mounted on top of the 96 well plate. After incubation, the [1-¹⁴C]oleic acid cell medium was transferred to a multi-well plate, sealed, and frozen at −20 °C for later analysis of acid-soluble metabolites (ASMs), before the cells were washed and harvested in 0.1 M NaOH. The ¹⁴CO₂ trapped in the filter, produced from cellular respiration and cell-associated (CA) radioactivity from glucose or oleic acid uptake, was measured by the addition of scintillation fluid (Ultima Gold XR, PerkinElmer) and counted on a 2450 MicroBeta² scintillation counter (PerkinElmer). Measurement of ASMs, which reflects incomplete FA β-oxidation and mainly consist of tricarboxylic acid cycle metabolites, was performed using a method modified from Skrede et al. [34]. From the [1-¹⁴C]oleic acid medium, 100 μL was transferred to an Eppendorf tube and precipitated with 300 μL cold HClO₄ (1 M) and 30 μL BSA (6%). Thereafter, the tube was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C before 200 μL of the supernatant was counted by liquid scintillation on Packard Tri-Carb 1900 TR (PerkinElmer). All results were adjusted for protein content, measured by the Bio-Rad protein assay using a VICTOR[™] X4 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer).

For glucose metabolism, the sum of ¹⁴CO₂ and remaining CA radioactivity was taken as a measurement of total cellular uptake of substrate: CO₂ + CA. Fractional glucose oxidation was calculated as CO₂/(CO₂ + CA). For calculation of total cellular oleic acid uptake, ASMs were also taken into account. The total uptake and fractional oxidation of oleic acid were thus calculated as CO₂ + CA + ASM and CO₂/(CO₂ + CA + ASM), respectively. Fractional oxidation represents the proportion of uptake that goes to oxidation and may or may not correlate with complete cellular oxidation.

2.3.2. Scintillation Proximity Assay (SPA)

To measure glucose and FA accumulation, cells were cultured with 1×10^4 cells/well on Cytostar-T[®] 96 well scintillation microplate or 96-Scintiplat[®] (PerkinElmer), respectively, in DMEM-glu or DMEM-ole for 24 h. Thereafter, accumulation of D-[¹⁴C(U)]glucose (0.5 μCi/mL, 200 μM) or [1-¹⁴C]oleic acid (0.5 μCi/mL, 100 μM) was measured by scintillation proximity assay (SPA) over 24 h as previously described [33]. In brief, cells were incubated during 24 h in the presence of radiolabeled substrates with measurements at 0, 2, 4, 6, 8, and 24 h on a 2450 MicroBeta² scintillation counter (PerkinElmer). The radiolabeled substrates taken up will accumulate in the adherent cells and become concentrated close to the scintillator embedded in the plastic bottom of each well. After the 24 h accumulation, the

cells were harvested in 0.1 M NaOH and protein content in the lysates were measured by the Bio-Rad protein assay using a VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer).

2.4. Metabolic Flexibility

To study the competition between glucose and FA metabolism, two different protocols were established. In the first protocol, cells were cultured in DMEM-glu or DMEM-glu/ole, both containing 10% FBS, for 30 h. Thereafter, the media were changed to DMEM-glu/ole supplemented with 0.5% FBS the last 18 h before 4 h CO₂ trapping with D-[¹⁴C(U)]glucose (0.5 μCi/mL, 200 μM). In the second protocol, cells were cultured as in the first protocol but during CO₂ trapping, two inhibitors of glucose and FA metabolism, 20 μM UK5099 (Sigma–Aldrich) or 10 μM etomoxir (Sigma–Aldrich), respectively, were added. The UK5099 and etomoxir were dissolved in DMSO and water, respectively, to create concentrated stocks solutions. Thus, their respective controls were DMSO and water alone.

2.5. MTT Assay

To assess if UK5099 or etomoxir affected cell viability, cells were cultured in the presence of UK5099 (2, 5, 10, 15, or 20 μM) or etomoxir (5, 10, 20, or 40 μM) for 4 h or 24 h. Thereafter, proliferation was determined using a CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 570 nm on a Tecan Infinite 200 microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). The analysis showed that these compounds, at 20 and 10 μM, respectively, over 4 h did not affect cell viability (data not shown).

2.6. Detection of Anion Superoxide Production (O₂⁻)

Cells were cultured with 9 × 10⁴ cells/well on Corning® CellBIND® 6 well plates (Corning) in DMEM-glu/ole for 48 h. The last 4 h, some parallels were incubated in the presence of UK5099 (20 μM) or etomoxir (10 μM). To measure mitochondrial anion superoxide (O₂⁻) production, cells were treated during 30 min with 5 μM MitoSOX™ Red (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). MitoSOX™ Red reagent permeates living cells and selectively targets the mitochondria. It is rapidly oxidized by O₂⁻ but not by other reactive oxygen species (ROS). Cells were harvested by trypsin release and resuspended in saline solution prior to analysis on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA). Per assay 1 × 10⁴ cells were measured and data were analyzed using the CellQuest software (Becton Dickinson).

2.7. Evaluation of Lipid Droplet (LD) Formation

2.7.1. Lipid Distribution by Thin Layer Chromatography (TLC)

Cells were cultured with 1.5 × 10⁵ cells/well on Corning® CellBIND® 12 well plates (Corning) in DMEM with 25 mM glucose for 24 h before being incubated with [1-¹⁴C]oleic acid (0.5 μCi/mL, 100 μM) for another 24 h. Thereafter, the cells were washed twice with PBS and harvested in 0.1% SDS. Cellular lipid distribution was analyzed as previously described [35] by extraction of the homogenized cell fraction, separation of lipids by thin layer chromatography (TLC) using a non-polar solvent mixture of hexane:diethyl ether:acetic acid (65:35:1), and quantification by liquid scintillation on Tri-Carb 1900 TR (PerkinElmer). Total protein was measured by Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) using a VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer).

2.7.2. Staining Neutral Lipids by Immunofluorescence

Cells were cultured with 3 × 10⁴ cells/well on 4 well chamber slides (Millipore, Billerica, MA, USA) for 48 h in DMEM with 25 mM glucose or DMEM-ole. Thereafter, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma–Aldrich) for 10 min at room temperature, followed by incubation in 0.1% Tween20 (Sigma–Aldrich) for 5 min. The LD staining was performed with a 1:10,000 dilution of a neutral lipid dye LD540 (kindly provided by Dr. Thiele), for 30 min [36]. This step was followed by 5

min incubation with the nuclear dye Hoechst 33,258 (Sigma–Aldrich). After washing with PBS, cover slips were mounted on microscopy chamber slides using Prolong Gold Antifade Reagent Mountant (Thermo Fisher Scientific). Fluorescence was visualized and photographed under a Nikon AR-1 confocal microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

2.8. Flow Cytometry

The intensity of LD540 fluorescent was also evaluated on a FACsCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Cells were cultured with 9×10^4 cells/well on Corning® CellBIND® 6 well plates (Corning) and treated as described above. Cells were harvested by trypsin release and resuspended in saline solution prior to analysis by flow cytometry. 1×10^4 cells per assay were measured. Data were analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson). Results were expressed as median of fluorescence (AU) from three independent experiments.

2.9. Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR)

The RNA extraction was achieved using TRIzol (Life Technologies) according to the manufacturers protocol. 0.5 µg of RNA was reversely transcribed into cDNA using an NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYTech, Lisbon, Portugal) following the manufacturer's instructions. The RT-PCR was performed in a LightCycler 480-II Instrument (Roche, Mannheim, Germany) using TaqMan Universal Master Mix (Roche). Analysis of the results was carried out using Qbase+ version 2.5 software (Biogazelle, Ghent, Belgium). Gene expression was calculated relative to the housekeeping gene ribosomal protein L13A (*RPL13A*). Sequence primers, probe, and PCR conditions are available upon request.

2.10. Statistical Analyses

Data are presented as mean \pm standard error mean (SEM) from three independent experiments with a minimum of three observations unless stated otherwise. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 6.01 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). The unpaired *t*-test was used to evaluate differences between N and OA groups, whereas the Mann–Whitney test was used to evaluate differences between haplogroups H and J. The paired *t*-test was used to evaluate the effect of different treatments compared to basal. Differences with *p*-values ≤ 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Basal Glucose and FA Metabolism

3.1.1. Basal Glucose and FA Metabolism

Basal glucose and oleic acid metabolism were analyzed in cybrids by measuring acute (4 h) oxidation and uptake as well as time-course accumulation over 24 h (Figure. 1). There were no changes in basal glucose metabolism between N and OA cybrids (Figure 1A,B). Furthermore, when evaluating the differences between the two haplogroups, OA-J had higher cell-associated glucose than OA-H (Figure 1C); there was a non-significant tendency towards higher complete oxidation in OA-J compared to OA-H cybrids (*p* = 0.0581 Figure 1C).

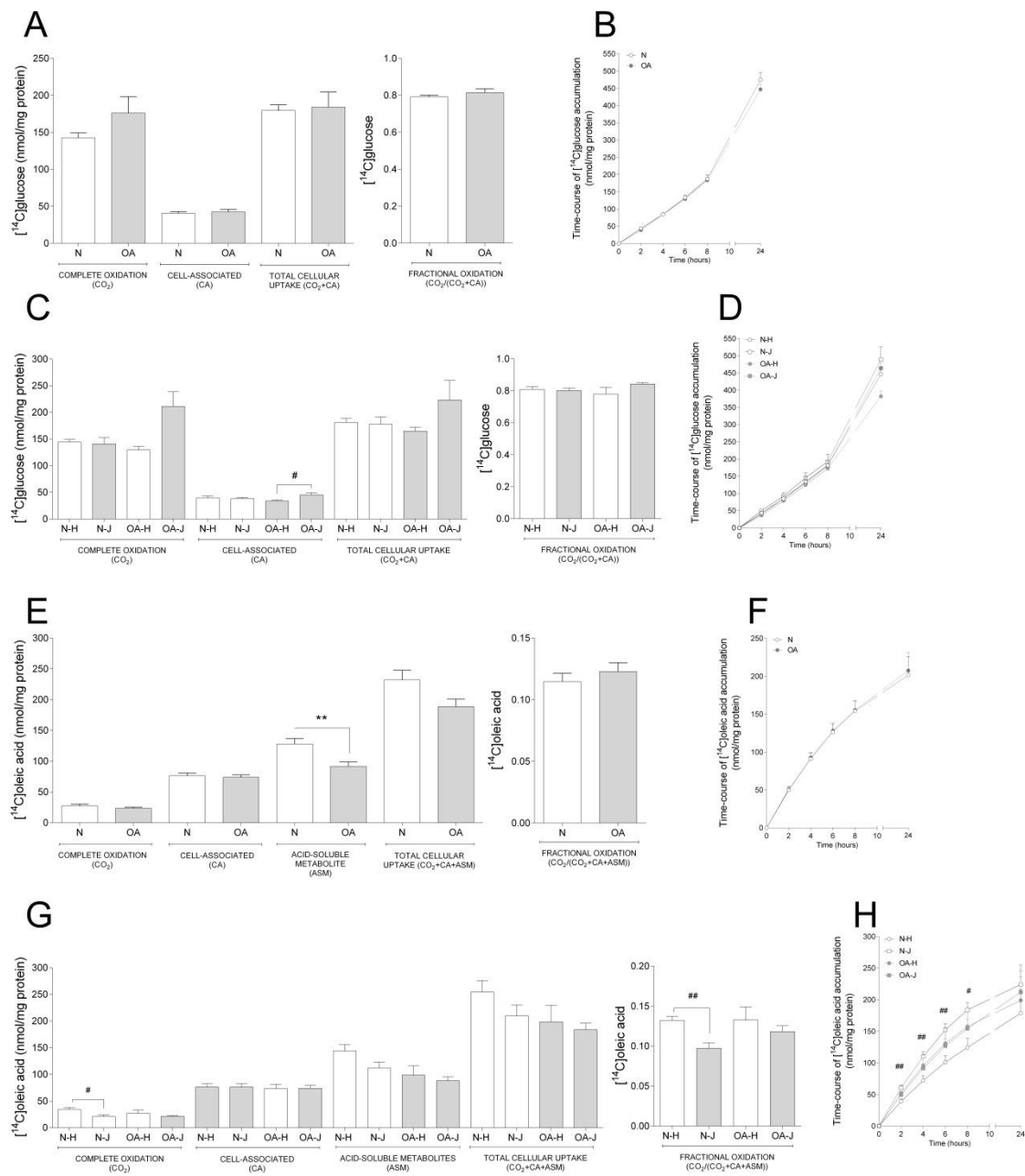


Figure 1. Basal glucose and fatty acid metabolism. Cybrids were cultured for 48 h in DMEM-glu (A–D, i.e., DMEM 5.5 mM glucose) or DMEM-ole (E–H, i.e., DMEM no glucose supplemented with 100 μM oleic acid). Thereafter, basal glucose and oleic acid metabolism were evaluated using D-[¹⁴C(U)]glucose (0.5 μCi/mL, 200 μM) or [1-¹⁴C]oleic acid (0.5 μCi/mL, 100 μM), respectively, and 4 h substrate oxidation assay (A, C, E, and G) or 24 h SPA (B, D, F, and H). (A,B) Basal glucose metabolism in healthy (N) and osteoarthritic (OA) cybrids. (C,D) Basal glucose metabolism in cybrids carrying haplogroups H or J. (E,F) Basal oleic acid metabolism in N and OA cybrids. (G,H) Basal oleic acid metabolism in cybrids carrying haplogroups H or J. N and OA data included the values for haplogroups H and J combined. All data were obtained from three independent experiments, each with four replicates and two clones per donor. Values are presented as mean ± SEM in nmol/mg protein. * Statistically significant difference between N and OA cybrids (** *p* ≤ 0.005, unpaired *t*-test). # Statistically significant difference between haplogroups (# *p* ≤ 0.05, ## *p* ≤ 0.005, Mann–Whitney test).

Examination of basal oleic acid metabolism (Figure 1E–H) showed that OA cybrids had lower ASM, reflecting incomplete FA β-oxidation, compared to N cybrids (Figure 1E), whereas the other parameters

were unchanged (Figure 1E,F). When evaluating the role of haplogroups, a lower complete and fractional oleic acid oxidation was observed in N-J compared to N-H cybrids (Figure 1G). Furthermore, oleic acid accumulation was overall higher in N-J than N-H cybrids the first 8 h of the time-course substrate incorporation (Figure 1H).

3.1.2. Comparison between Basal Glucose and FA Metabolism

In order to see differences in degree of glucose compared to oleic acid, we performed a comparative analysis between the synonymous data obtained from the substrate oxidation assay with the two substrates as reported separately above. We observed that both N and OA cybrids had higher CA, but lower complete and fractional oxidation of oleic acid compared to glucose, indicating a preference towards glucose oxidation. This was reflected within the N cybrids, where both haplogroups had lower complete and fractional oxidation but higher CA of oleic acid. However, within the haplogroups of OA cybrids, the OA-J had both lower complete and fractional oxidation of oleic acid, whereas OA-H only had lower fractional oxidation (Table 1).

Table 1. Comparison between basal glucose and FA metabolism from healthy (N) and osteoarthritis (OA) cybrids and carrying haplogroups H or J.

	Complete Substrate Oxidation (CO ₂) (nmol/mg Protein)		Cell-Associated (CA) (nmol/mg Protein)		Total Cellular Uptake (CO ₂ + CA) (nmol/mg Protein)		Fractional Substrate Oxidation(CO ₂ /(CO ₂ + CA))	
	[¹⁴ C]glucose	[¹⁴ C]oleic acid	[¹⁴ C]glucose	[¹⁴ C]oleic acid	[¹⁴ C]glucose	[¹⁴ C]oleic acid	[¹⁴ C]glucose	[¹⁴ C]oleic acid
N	58.52 ± 3.86	27.44 ± 3.15 aaaa	45.92 ± 5.73	76.29 ± 4.46 aaaa	104.44 ± 9.29	104.00 ± 7.07	0.57 ± 0.02	0.25 ± 0.02 aaaa
OA	66.28 ± 8.47	23.31 ± 2.29 aaa	50.41 ± 9.19	73.76 ± 3.93 a	116.60 ± 17.42	97.08 ± 5.56	0.59 ± 0.02	0.23 ± 0.01 aaaa
N-H	60.10 ± 3.93	34.01 ± 3.83 aaa	49.69 ± 7.40	76.30 ± 6.89 a	109.78 ± 10.86	110.40 ± 10.56	0.56 ± 0.02	0.30 ± 0.01 aaaa
N-J	56.95 ± 7.00	20.87 ± 3.41 aaa	42.16 ± 9.17	76.27 ± 6.33 a	99.11 ± 15.8	97.59 ± 9.61	0.60 ± 0.04	0.20 ± 0.01 aaaa
OA-H	56.48 ± 11.78	26.84 ± 6.38	46.73 ± 17.53	73.12 ± 8.23	102.80 ± 28.94	99.96 ± 13.94	0.57 ± 0.06	0.26 ± 0.01 ^a
OA-J	71.18 ± 11.42	21.55 ± 1.61 aa	52.26 ± 11.80	74.08 ± 4.84	123.4 ± 23.07	95.63 ± 5.85	0.59 ± 0.02	0.22 ± 0.01 aaaa

Values are presented as mean ± SEM. A statistically significant versus [¹⁴C]glucose (^a $p \leq 0.05$, ^{aa} $p \leq 0.005$, ^{aaa} $p \leq 0.001$, ^{aaaa} $p \leq 0.0001$, unpaired *t*-test). N, healthy; OA, osteoarthritis.

3.2. Metabolic Flexibility

The results obtained in basal experiments showed that cybrids from N and OA donors oxidize more glucose, whereas they have higher CA of oleic acid. Thus, we wanted to examine how addition of oleic acid affected the cybrids' glucose metabolism. Compared to basal (DMEM-glu), oleic acid increased complete oxidation and total cellular uptake of glucose in N but not in OA cybrids (Figure 2A). Complete and fractional glucose oxidation were lower in OA cybrids compared to N (Figure 2A). Evaluating the results from the functional studies, gene expression analyses were performed. mRNA expression of carnitine palmitoyltransferase 1B (*CPT1B*) and mitochondrial pyruvate carrier 2 (*MPC2*) were lower in OA than in N cybrids (Figure 2B). The mitochondrial superoxide (O₂⁻) production was higher in OA cybrids when oleic acid was present in the culture medium (Figure 2C). Combined, these results indicate that N cybrids are more flexible than OA when the supply of energy changes.

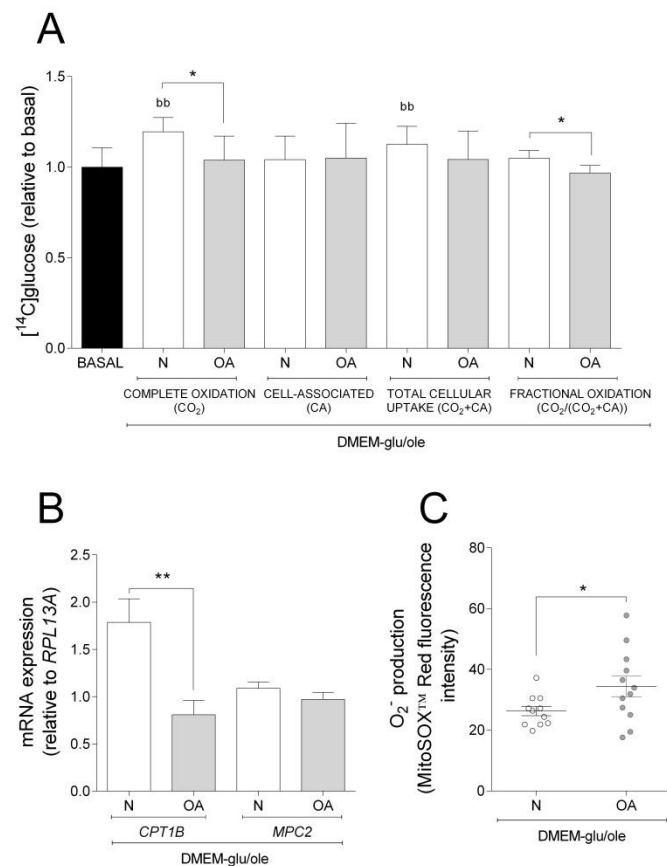


Figure 2. Effect of oleic acid on glucose metabolism, mRNA expression, and O_2^- production. Effect of culturing cells in DMEM-glu/ole (i.e., DMEM 5.5 mM glucose supplemented with 100 μ M oleic acid) compared to DMEM-glu (basal, i.e., DMEM 5.5 mM glucose). **(A)** Glucose metabolism. **(B)** mRNA expressions of carnitine palmitoyltransferase 1B (*CPT1B*) and mitochondrial pyruvate carrier 2 (*MPC2*) normalized to the expression of *RPL13A*. **(C)** Anion superoxide production (O_2^-). N and OA data included the values for haplogroups H and J combined. All data were obtained from three independent experiments, each with four replicates and two clones per donor. Values are presented as mean \pm SEM relative to basal. * Statistically significant difference between N and OA cybrids (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, unpaired *t*-test). ^b Statistically significant versus basal (^{bb} $p \leq 0.01$, paired *t*-test). N, healthy cybrids; OA, osteoarthritis cybrids.

To further evaluate the metabolic flexibility, cells were cultured in DMEM-glu/ole and glucose and oleic acid metabolism in the presence or absence of the mitochondrial inhibitors etomoxir (Figure 3A) or UK5099 (Figure 3B), respectively. Etomoxir inhibits FA oxidation by targeting *CPT1B*, a mitochondrial carrier of FAs, whereas UK5099 is an inhibitor of *MPC* [37–39]. Inhibition by etomoxir increased complete oxidation, CA, and total cellular uptake of glucose in N cybrids compared to basal, but not in OA cybrids where fractional glucose oxidation was decreased (Figure 3A). Inhibition by UK5099 increased complete and fractional oleic acid oxidation in OA cybrids compared to basal but not in N cybrids (Figure 3B). Furthermore, N cybrids had a slight tendency towards increased glucose oxidation (ns, $p = 0.0675$) compared to OA cybrids (Figure 3A), whereas these cells oxidized more oleic acid compared to N cybrids when cultured in the presence of UK5099 (Figure 3B). Additionally, cells cultured in presence of UK5099 had higher O_2^- production in N and OA cybrids, whereas gene expression of mitofusin 2 (*MFN2*) was increased in N but not OA cybrids (Figure 3C,D). No effect of etomoxir was observed on the levels of O_2^- production and *MFN2* mRNA expression (Figure 3C,D). Mitochondrial fusion plays a critical role in maintaining functional mitochondria when cells experience a metabolic change. These results suggest that N cybrids are able to increase glucose metabolism when

the FA pathway is blocked, whereas OA cybrids were only able to increase oleic acid oxidation when the glucose pathway was blocked. Combined, this provides further evidence for higher metabolic flexibility in cybrids carrying mitochondria from healthy individuals compared to patients with OA.

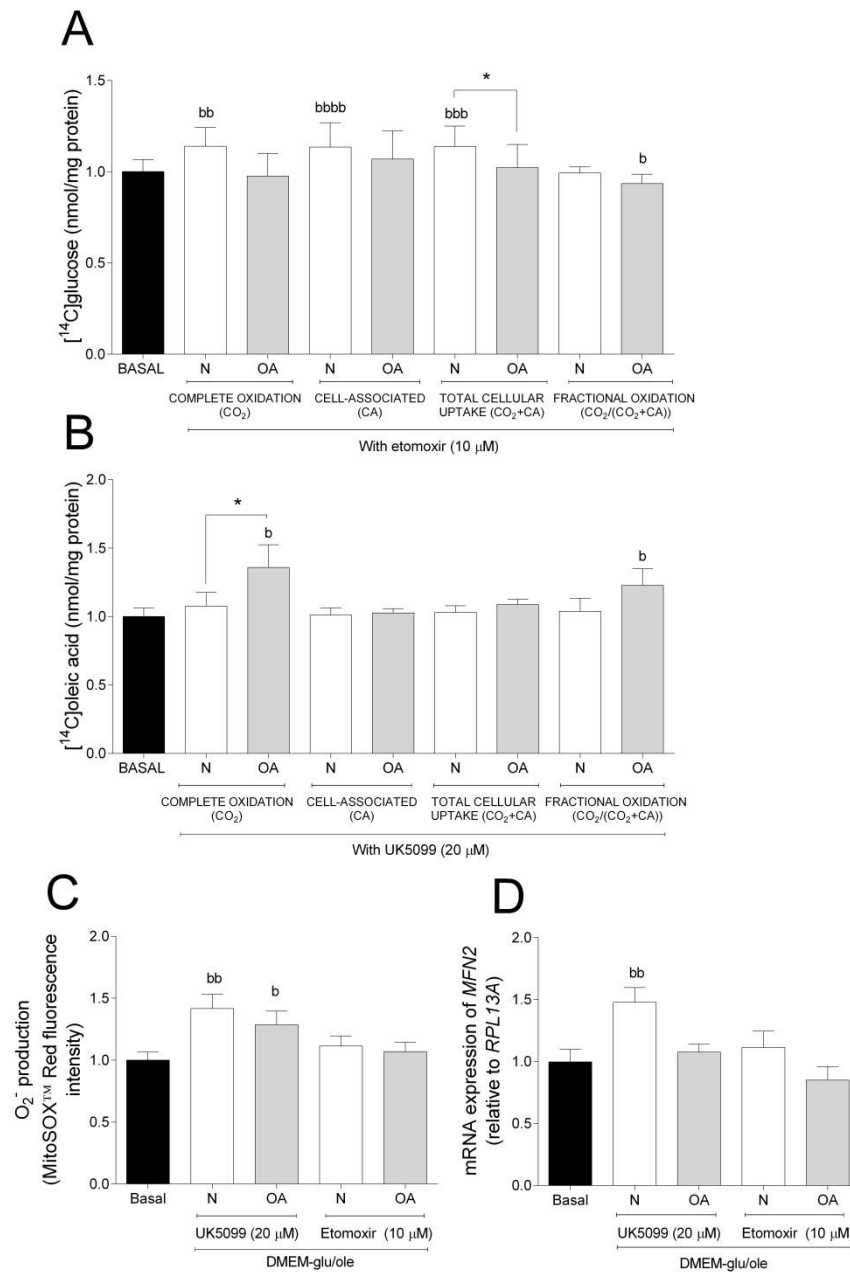


Figure 3. Metabolic flexibility. **(A)** Effect of 10 μM etomoxir on glucose metabolism. **(B)** Effect of 20 μM UK5099 on oleic acid metabolism. **(C)** Effect of 10 μM etomoxir or 20 μM UK5099 on anion superoxide (O₂⁻) production. **(D)** Effect of 10 μM etomoxir or 20 μM UK5099 on mRNA expression of mitofusin 2 (MFN2). N and OA data included the values for haplogroups H and J combined. All data were obtained from three independent experiments, each with four replicates and two clones per donor. Values are presented as mean ± SEM relative to basal (DMEM-glu/ole, i.e., DMEM 5.5 mM glucose supplemented with 100 μM oleic acid). * Statistically significant difference between N and OA cybrids (* p ≤ 0.05, unpaired t-test). ^b Statistically significant versus basal (^b p ≤ 0.05, ^{bb} p ≤ 0.01, ^{bbb} p ≤ 0.001, ^{bbbb} p ≤ 0.0001 paired t-test). N, healthy cybrids; OA, osteoarthritis cybrids.

3.3. Evaluation of Lipid Distribution and LD Formation

To study the incorporation of oleic acid into lipids, TLC was performed. Most of the oleic acid was incorporated into triacylglycerol (TAG) and phospholipids (PL), accounting for approximately 70% and 25% of the total lipid incorporation, respectively (Figure 4A). The cybrids presented different lipid distribution patterns: N cybrids had higher incorporation into PL and cholesteryl ester (CE), but lower incorporation into TAG, compared to OA cybrids (Figure 4A). With TAG being the major contributor to total FA incorporation and LD formation, the differences among haplogroups were examined for this lipid class; OA-J showed higher TAG incorporation than OA-H cybrids (Figure 4B).

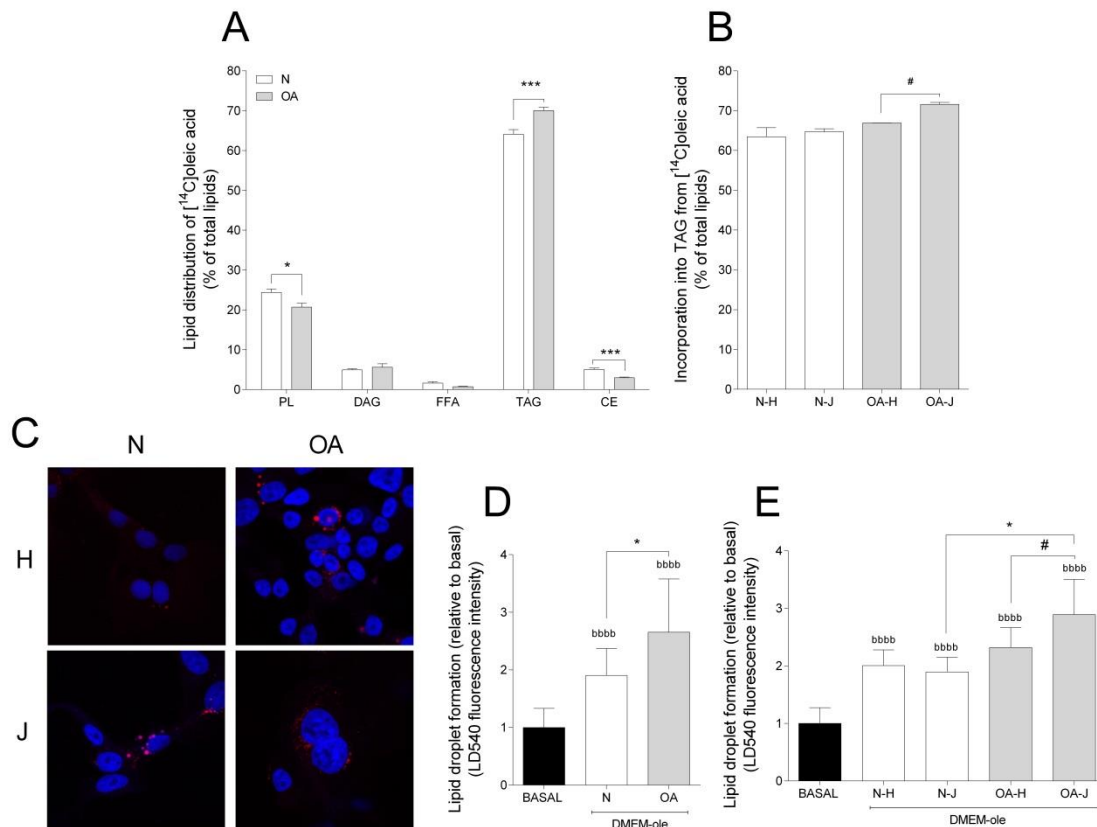


Figure 4. Lipid distribution and lipid droplet formation. (A) Lipid distribution in healthy (N) and osteoarthritis (OA) cybrids after 24 h incubation with [1-¹⁴C]oleic acid. PL, phospholipid; DAG, diacylglycerol; FFAs, free fatty acids; TAG, triacylglycerol; CE, cholesteryl ester. (B) Incorporation of [1-¹⁴C]oleic acid into TAG in N and OA cybrids carrying haplogroup H or J. (C) One representative image of cybrids after culturing in DMEM-ole (i.e., DMEM no glucose supplemented with 100 mM oleic acid) for 48 h before staining lipid droplets with LD540 (red) and nuclei with Hoechst 33,258 (blue). (D,E) Quantification of lipid droplet formation by flow cytometry in N and OA cybrids (D), carrying haplogroups H or J (E) relative to basal (DMEM 25 mM glucose). N and OA data included the values for haplogroups H and J combined. All data were obtained from three independent experiments, each with at least three replicates and two clones per donor. Values are presented as mean ± SEM relative to total lipids (A and B) or relative to basal (D and E). * Statistically significant difference between N and OA cybrids (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, unpaired t -test). # Statistically significant difference between haplogroups (# $p \leq 0.05$, Mann–Whitney test). ^b Statistically significant versus basal (^{bbbb} $p \leq 0.0001$, paired t -test).

Taking into account that TAG is mainly stored as LDs, intracellular storage depots of neutral lipids [40], LD formation was also analyzed. Addition of oleic acid to cell culture medium was used as an efficient strategy to enhance and study the intracellular accumulation of LDs. Compared to basal,

LD formation increased in both groups (Figure 4C,D). Furthermore, N cybrids incorporated less oleic acid into LDs than OA (Figure 4D). In coherence with higher TAG incorporation in OA-J cybrids, LD formation was higher in OA-J compared to OA-H and N-J haplogroups (Figure 4E).

4. Discussion

The results obtained in this study enhance our understanding of mitochondrial metabolism in OA and suggests a mitochondrial dysfunction related to impaired metabolic flexibility during the OA process.

To study if different substrates could influence the metabolism in N and OA cybrids, basal metabolism of glucose and oleic acid were examined. No differences in glucose metabolism were observed between N and OA cybrids. However, examination of basal oleic acid metabolism showed that OA cybrids had lower ASM, reflecting incomplete FA metabolism compared to N cybrids. Although glucose is the main energy source in chondrocytes [41], lipids are also necessary, both to be utilized for energy and to be incorporated as structural components and signaling molecules [42]. Thus, lower ASM levels indicate less efficient mitochondria from OA donors, supporting the data obtained in chondrocytes where it has been established a relationship between mitochondrial dysfunction and OA processes [10,43].

When the role of mtDNA haplogroups in basal metabolism was analyzed, only OA-J cybrids showed higher cell-associated glucose, whereas N-J cybrids showed lower FA oxidation compared to their respective H haplogroup. This could be a result of the characteristic bioenergetics of mtDNA haplogroup J. In agreement with data from a previous study, cybrids from healthy donors carrying haplogroup J seemed to be able to increase cell survival by mitochondrial respiration and glycolysis, decreasing ATP and reactive oxygen species production [24].

Glucose and FA metabolism are two of the most significant mechanisms in order to obtain energy [5,44]. The cybrids were mainly glycolytic, favoring glucose over oleic acid for oxidation. Despite this, OA cybrids had lower mRNA levels of *CPT1*, a mitochondrial transporter of FAs. Others have reported that chondrocytes also mainly are glycolytic, with 25% of the ATP produced through OXPHOS [45]. When co-culturing the cells with glucose and oleic acid (with or without etomoxir or UK5099), the results showed that only N cybrids increased glucose metabolism, thus remaining glycolytic even in the presence of oleic acid and etomoxir. The OA cybrids were, on the other hand, unable to adapt their glucose metabolism with the changed energetic conditions, thus suggesting a mitochondrial impairment and preference of FAs for oxidation. The OA development has been related to mitochondrial dysfunction and cellular damage due to the impairments in mitochondrial function [10–15]. Superoxide production was found to be higher in OA than N cybrids. Mitochondrial ROS production is directly dependent on mitochondrial function and an increase of this parameter has been linked to the OA pathogenesis [46]. Furthermore, it has also been suggested that mitochondrial dysfunction induces FA oxidation and oxidative stress [47–49]. Thus, this study may confirm the role of mitochondrial dysfunction in OA as seen by the results from OA cybrids with preference of FAs for oxidation and increased ROS production.

Analyzing the effect of inhibitors in the cybrids, UK5099 increased ROS levels in both N and OA cybrids, but only N cybrids had higher mRNA expression of *MFN2*. Mitochondrial dynamics are altered by different metabolic status in the cell and this is controlled by fission and fusion processes [50]. In addition, mitochondrial fusion, through the phosphorylation of *MFN2*, controls the autophagy of dysfunctional mitochondria to maintain a healthy status [51]. Thus, these results are in line with the fact that OA cybrids showed lower adaptative response under metabolic stress compared to N cybrids.

A shortcoming of the study is the limited examination of cell viability and functionality, which requires future studies. Furthermore, it will be relevant to evaluate the mitochondrial functionality and integrity more extensively.

Taken together, the data demonstrate that cybrids from OA donors behave differently from N donors. Particularly interesting was the finding that OA cybrids showed lower metabolic flexibility

and increased oxidative stress compared to N cybrids when exposed to changed nutrient supply. This concept was described in bovine chondrocytes in 2015, where N chondrocytes showed the healthy characteristic of metabolic flexibility, associated with cell survival during nutrient stress by upregulation of mitochondrial respiration and reduction in ROS production [14]. Although great progress has been made in understanding OA, the current knowledge of metabolic flexibility in chondrocytes is still at an early stage. This study complements the exiting knowledge, and combined it suggests that poor regulation of metabolic flexibility could be linked to the etiology of OA.

Finally, in the present study it was observed that the transmitochondrial cybrids preferred to accumulate oleic acid compared to glucose. When lipid distribution was studied, a lower incorporation of oleic acid into PLs and CE was observed in OA compared to N cybrids. However, interestingly, more oleic acid was incorporated into TAG in OA cybrids, and they also showed higher LDs formation compared to N cybrids. Others have reported that free FAs can be incorporated by cartilage and chondrocytes into phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, and TAG [16–20]. The PLs are important for normal cartilage maintenance and TAG for storage in lipid droplets (LDs) [42]. In the second case, it has been hypothesized that FAs stored in LDs may serve a protective role against the stressors [52,53]. Surprisingly, haplogroup J was the major contributor to this TAG accumulation and showed higher formation of LDs. This finding supports the hypothesis that subjects with mtDNA haplogroup J confer protection in OA, where altered lipid metabolism may be a risk factor [16,24,25]. As mentioned before, different studies suggested that mtDNA haplogroup J protects against incidence and progression of OA in knees and hips [26]. At a molecular level, the relationship between haplogroup J and protection of OA remains to be fully elucidated. However, it is reasonable to think that N-J and OA-J accumulate more LDs than N-H and OA-H in order to protect the cell against impairments in FA metabolism as a protective mechanism against incidence and progression of OA.

5. Conclusions

The transmitochondrial cybrids preferred to oxidize glucose and accumulate lipids. Comparison of N and OA cybrids showed no differences in basal glucose metabolism but lower incomplete FA β -oxidation in OA cybrids associated with lower gene expression of *CPT1B*. Furthermore, OA cybrids accumulated more TAG and LDs than N cybrids. Importantly, an impaired metabolic flexibility was observed in OA cybrids, providing further evidence towards a mitochondrial dysfunction in the OA pathogenesis.

Author Contributions: F.J.B. and M.F.-M. contributed equally in conceiving, designing and coordinating the study; both helped to draft the manuscript; A.D.-F. carried out the cybrid experiments, interpreted data as well as helped to draft the manuscript; J.L. designed and supervised the substrate oxidation assay and SPA, interpreted data, and helped to draft the manuscript; T.H.-G. generated the cybrids and helped with culturing of cybrids; M.E.V.-M. helped with culturing of cybrids and subsequent experimental procedures; I.R.-P. supervised the statistical procedures. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria CIBER-BBN CB06/01/0040-S pain, RETIC-RIER-RD16/0012/0002, PI12/00329, PI14/01254, PI16/02124, PRB3-ISCI-PT17/0019 and PI17/00210 integrated in the National Plan for Scientific Program, Development and Technological Innovation 2013-2016 and funded by the ISCIII-General Subdirection of Assessment and Promotion of Research-European Regional Development Fund (FEDER) “A way of making Europe”. I.R.-P. is supported by Contrato Miguel Servet tipo II-Fondo de Investigación Sanitaria (CPII17/00026). M.F.-M. is supported by Contrato CIBER-BBN. A.D.F. is supported by FIS PI17/00210. M.E.V.-M. is supported by FIS PI16/02124. J.L. is supported by the University of Oslo.

Acknowledgments: We want to thank all donors and the collaborating clinicians from the Rheumatology Division of CHUAC for providing blood samples. Furthermore, thanks to Catalina Sueiro-Lopez for support on the confocal microscopy at the Universidade da Coruña (SAI-UDC). Noa Goyanes-Rey at INIBIC-CHUAC and Camilla Stensrud and Hege Gilbø Bakke at the University of Oslo for their support and assistance in the laboratory. A.D.F. was the beneficiary of short-term scientific missions from MitoEAGLE (COST Action CA15203) and a predoctoral grant from INIDITEX- University of A Coruña (UDC) (Spain).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kraus, V.B.; Blanco, F.J.; Englund, M.; Karsdal, M.A.; Lohmander, L.S. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 1233–1241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Blanco, F.J. Osteoarthritis and atherosclerosis in joint disease. *Reumatol. Clin.* **2018**, *14*, 251–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Blanco, F.J.; Rego-Perez, I. Mitochondria and mitophagy: Biosensors for cartilage degradation and osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2018**, *26*, 989–991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Francisco, V.; Perez, T.; Pino, J.; Lopez, V.; Franco, E.; Alonso, A.; Gonzalez-Gay, M.A.; Mera, A.; Lago, F.; Gomez, R.; et al. Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks. *J. Orthop. Res.* **2017**. [[CrossRef](#)]
5. Smith, R.L.; Soeters, M.R.; Wust, R.C.I.; Houtkooper, R.H. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocr. Rev.* **2018**, *39*, 489–517. [[CrossRef](#)]
6. Mobasher, A.; Rayman, M.P.; Gualillo, O.; Sellam, J.; van der Kraan, P.; Fearon, U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 302–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Galgani, J.E.; Moro, C.; Ravussin, E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2008**, *295*, E1009–E1017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Goodpaster, B.H.; Sparks, L.M. Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 1027–1036. [[CrossRef](#)]
9. Kelley, D.E.; Mandarino, L.J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: A reexamination. *Diabetes* **2000**, *49*, 677–683. [[CrossRef](#)]
10. Blanco, F.J.; Lopez-Armada, M.J.; Maneiro, E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* **2004**, *4*, 715–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Blanco, F.J.; Rego, I.; Ruiz-Romero, C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2011**, *7*, 161–169. [[CrossRef](#)]
12. Wu, L.; Liu, H.; Li, L.; Cheng, Q.; Li, H.; Huang, H. Mitochondrial pathology in osteoarthritic chondrocytes. *Curr. Drug Targets* **2014**, *15*, 710–719. [[CrossRef](#)]
13. Gavriilidis, C.; Miwa, S.; von Zglinicki, T.; Taylor, R.W.; Young, D.A. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheum.* **2013**, *65*, 378–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lane, R.S.; Fu, Y.; Matsuzaki, S.; Kinter, M.; Humphries, K.M.; Griffin, T.M. Mitochondrial respiration and redox coupling in articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*, 54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rufino, A.T.; Rosa, S.C.; Judas, F.; Mobasher, A.; Lopes, M.C.; Mendes, A.F. Expression and function of K(ATP) channels in normal and osteoarthritic human chondrocytes: Possible role in glucose sensing. *J. Cell Biochem.* **2013**, *114*, 1879–1889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cillero-Pastor, B.; Eijkel, G.; Kiss, A.; Blanco, F.J.; Heeren, R.M. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry-based molecular distribution distinguishing healthy and osteoarthritic human cartilage. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8909–8916. [[CrossRef](#)]
17. Castro-Perez, J.M.; Kamphorst, J.; DeGroot, J.; Lafeber, F.; Goshawk, J.; Yu, K.; Shockcor, J.P.; Vreeken, R.J.; Hankemeier, T. Comprehensive LC-MS E lipidomic analysis using a shotgun approach and its application to biomarker detection and identification in osteoarthritis patients. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 2377–2389. [[CrossRef](#)]
18. Lippiello, L.; Walsh, T.; Fienhold, M. The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. *Metabol. Clin. Exp.* **1991**, *40*, 571–576. [[CrossRef](#)]
19. Rocha, B.; Ruiz-Romero, C.; Blanco, F.J. Mass spectrometry imaging: A novel technology in rheumatology. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 52–63. [[CrossRef](#)]
20. Nazli, S.A.; Loeser, R.F.; Chubinskaya, S.; Willey, J.S.; Yammani, R.R. High fat-diet and saturated fatty acid palmitate inhibits IGF-1 function in chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **2017**, *25*, 1516–1521. [[CrossRef](#)]
21. Valdes, A.M.; Goldring, M.B. Mitochondrial DNA haplogroups and ageing mechanisms in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, *76*, 939–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Soto-Hermida, A.; Fernandez-Moreno, M.; Oreiro, N.; Fernandez-Lopez, C.; Rego-Perez, I.; Blanco, F.J. mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *Mitochondrion* **2014**, *15*, 18–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Shen, J.M.; Feng, L.; Feng, C. Role of mtDNA haplogroups in the prevalence of osteoarthritis in different geographic populations: A meta-analysis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108896. [[CrossRef](#)]
24. Fernandez-Moreno, M.; Soto-Hermida, A.; Vazquez-Mosquera, M.E.; Cortes-Pereira, E.; Relano, S.; Hermida-Gomez, T.; Pertega, S.; Oreiro-Villar, N.; Fernandez-Lopez, C.; Garesse, R.; et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence the risk of incident knee osteoarthritis in OAI and CHECK cohorts. A meta-analysis and functional study. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, *76*, 1114–1122. [[CrossRef](#)]
25. Blanco, F.J.; Valdes, A.M.; Rego-Perez, I. Mitochondrial DNA variation and the pathogenesis of osteoarthritis phenotypes. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2018**, *14*, 327–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rego-Perez, I.; Fernandez-Moreno, M.; Fernandez-Lopez, C.; Arenas, J.; Blanco, F.J. Mitochondrial DNA haplogroups: Role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 2387–2396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chomyn, A. Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells. *Methods Enzymol.* **1996**, *264*, 334–339.
28. Strobbe, D.; Caporali, L.; Iommarini, L.; Maresca, A.; Montopoli, M.; Martinuzzi, A.; Achilli, A.; Olivieri, A.; Torroni, A.; Carelli, V.; et al. Haplogroup J mitogenomes are the most sensitive to the pesticide rotenone: Relevance for human diseases. *Neurobiol. Dis.* **2018**, *114*, 129–139. [[CrossRef](#)]
29. Silva, D.F.; Selfridge, J.E.; Lu, J.; Lezi, E.; Roy, N.; Hutfles, L.; Burns, J.M.; Michaelis, E.K.; Yan, S.; Cardoso, S.M.; et al. Bioenergetic flux, mitochondrial mass and mitochondrial morphology dynamics in AD and MCI cybrid cell lines. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 3931–3946. [[CrossRef](#)]
30. Cruz-Bermudez, A.; Vicente-Blanco, R.J.; Hernandez-Sierra, R.; Montero, M.; Alvarez, J.; Gonzalez Manrique, M.; Blazquez, A.; Martin, M.A.; Ayuso, C.; Garesse, R.; et al. Functional Characterization of Three Concomitant MtDNA LHON Mutations Shows No Synergistic Effect on Mitochondrial Activity. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146816. [[CrossRef](#)]
31. Wilkins, H.M.; Carl, S.M.; Swerdlow, R.H. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrialriopathies. *Redox Biol.* **2014**, *2*, 619–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sazonova, M.A.; Sinyov, V.V.; Ryzhkova, A.I.; Galitsyna, E.V.; Melnichenko, A.A.; Postnov, A.Y.; Orekhov, A.N.; Sobenin, I.A. Cybrid Models of Pathological Cell Processes in Different Diseases. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2018**, *2018*, 4647214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wensaas, A.J.; Rustan, A.C.; Lovstedt, K.; Kull, B.; Wikstrom, S.; Drevon, C.A.; Hallen, S. Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 961–967. [[CrossRef](#)]
34. Skrede, S.; Bremer, J.; Berge, R.K.; Rustan, A.C. Stimulation of fatty acid oxidation by a 3-thia fatty acid reduces triacylglycerol secretion in cultured rat hepatocytes. *J. Lipid Res.* **1994**, *35*, 1395–1404.
35. Gaster, M.; Rustan, A.C.; Aas, V.; Beck-Nielsen, H. Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: Evidence from cultured myotubes. *Diabetes* **2004**, *53*, 542–548. [[CrossRef](#)]
36. Spandl, J.; White, D.J.; Peychl, J.; Thiele, C. Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540. *Traffic* **2009**, *10*, 1579–1584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hildyard, J.C.; Ammala, C.; Dukes, I.D.; Thomson, S.A.; Halestrap, A.P. Identification and characterisation of a new class of highly specific and potent inhibitors of the mitochondrial pyruvate carrier. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1707*, 221–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zhong, Y.; Li, X.; Yu, D.; Li, Y.; Long, Y.; Yuan, Y.; Ji, Z.; Zhang, M.; Wen, J.G.; Nesland, J.M.; et al. Application of mitochondrial pyruvate carrier blocker UK5099 creates metabolic reprogram and greater stem-like properties in LnCap prostate cancer cells in vitro. *Oncotarget* **2015**, *6*, 37758–37769. [[CrossRef](#)]
39. Rupp, H.; Zarain-Herzberg, A.; Maisch, B. The use of partial fatty acid oxidation inhibitors for metabolic therapy of angina pectoris and heart failure. *Herz* **2002**, *27*, 621–636. [[CrossRef](#)]
40. Khatchadourian, A.; Bourque, S.D.; Richard, V.R.; Titorenko, V.I.; Maysinger, D. Dynamics and regulation of lipid droplet formation in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglia. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1821*, 607–617. [[CrossRef](#)]
41. Otte, P. Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Z Rheumatol.* **1991**, *50*, 304–312.

42. Villalvilla, A.; Gomez, R.; Largo, R.; Herrero-Beaumont, G. Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 20793–20808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liu, H.; Li, Z.; Cao, Y.; Cui, Y.; Yang, X.; Meng, Z.; Wang, R. Effect of chondrocyte mitochondrial dysfunction on cartilage degeneration: A possible pathway for osteoarthritis pathology at the subcellular level. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20*, 3308–3316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Muoio, D.M. Metabolic inflexibility: When mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. *Cell* **2014**, *159*, 1253–1262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lee, R.B.; Urban, J.P. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem. J.* **1997**, *321*, 95–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Majiene, D.; Kuseliauskyte, J.; Stimbirys, A.; Jekabsone, A. Comparison of the Effect of Native 1,4-Naphthoquinones Plumbagin, Menadione, and Lawsone on Viability, Redox Status, and Mitochondrial Functions of C6 Glioblastoma Cells. *Nutrients* **2019**, *11*, 1294. [[CrossRef](#)]
47. Audano, M.; Pedretti, S.; Crestani, M.; Caruso, D.; De Fabiani, E.; Mitro, N. Mitochondrial dysfunction increases fatty acid beta-oxidation and translates into impaired neuroblast maturation. *FEBS Lett.* **2019**, *593*, 3173–3189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Flaquer, A.; Rospleszcz, S.; Reischl, E.; Zeilinger, S.; Prokisch, H.; Meitinger, T.; Meisinger, C.; Peters, A.; Waldenberger, M.; Grallert, H.; et al. Mitochondrial GWA Analysis of Lipid Profile Identifies Genetic Variants to Be Associated with HDL Cholesterol and Triglyceride Levels. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126294. [[CrossRef](#)]
49. Jin, Y.; Tan, Y.; Chen, L.; Liu, Y.; Ren, Z. Reactive Oxygen Species Induces Lipid Droplet Accumulation in HepG2 Cells by Increasing Perilipin 2 Expression. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3445. [[CrossRef](#)]
50. Chan, D.C. Fusion and fission: Interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* **2012**, *46*, 265–287. [[CrossRef](#)]
51. Murata, D.; Arai, K.; Iijima, M.; Sesaki, H. Mitochondrial Division, Fusion and Degradation. *J. Biochem.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Feng, Y.Z.; Lund, J.; Li, Y.; Knabenes, I.K.; Bakke, S.S.; Kase, E.T.; Lee, Y.K.; Kimmel, A.R.; Thoresen, G.H.; Rustan, A.C.; et al. Loss of perilipin 2 in cultured myotubes enhances lipolysis and redirects the metabolic energy balance from glucose oxidation towards fatty acid oxidation. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 2147–2161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Listenberger, L.L.; Han, X.; Lewis, S.E.; Cases, S.; Farese, R.V., Jr.; Ory, D.S.; Schaffer, J.E. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3077–3082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

