



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Grupo de Investigación
de Reumatología



instituto de
investigación biomédica
de a coruña

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Estudio de la respuesta mitocondrial en la patología artrósica utilizando un modelo celular *in vitro*, bajo diferentes concentraciones de glucosa

Estudo da resposta mitocondrial na patoloxía artrósica, utilizando un modelo celular *in vitro*, fronte a diferentes concentracións de glicosa

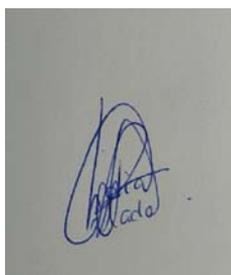
Study of mitochondrial response in osteoarthritis pathology using an *in vitro* cellular model, testing different glucose concentrations

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

AUTORA: LIDIA COLLADO RODRÍGUEZ

Directora: Mercedes Fernández Moreno

Tutora: María Esther Rodríguez Belmonte



FERNANDEZ
Z MORENO
MERCEDES
-
44087596T

Firmado digitalmente por
FERNANDEZ
MORENO
MERCEDES -
44087596T
Fecha:
2020.07.22
11:19:51 +02'00'

RODRIGUEZ
BELMONTE
MARIA
ESTHER - DNI
32776974L

Firmado digitalmente por
RODRIGUEZ BELMONTE MARIA
ESTHER - DNI 32776974L
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, o=UNIVERSIDAD DE A
CORUÑA, ou=CERTIFICADO
ELECTRONICO DE EMPLEADO
PUBLICO, ou=BIOLOXIA, ou=6682,
serialNumber=IDCES-32776974L,
sn=RODRIGUEZ BELMONTE,
givenName=MARIA ESTHER,
cn=RODRIGUEZ BELMONTE MARIA
ESTHER - DNI 32776974L
Fecha: 2020.07.22 02:31:15 +02'00'

Mercedes Fernández-Moreno Doctora en Biología, investigadora postdoctoral en el Instituto de Investigaciones Biomédicas da Coruña (INBIC)-Complejo Hospitalario de A Coruña (CHUAC).

INFORMA:

Que el presente Trabajo de Fin de Master titulado **“Estudio de la respuesta mitocondrial en la patología artrósica utilizando un modelo celular *in vitro*, bajo diferentes concentraciones de glucosa”** que para optar al Master en Biología Molecular, Celular y Genética presenta **Doña Lidia Collado Rodríguez**, ha sido realizado bajo mi dirección en el Grupo de investigación en Reumatología en el laboratorio de investigación de INIBIC, y que hallándose concluido, autorizo a su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

A Coruña, 22 Julio 2020

FERNANDEZ
MORENO
MERCEDES
44087596T

Firmado digitalmente por
FERNANDEZ
MORENO MERCEDES
- - 44087596T
Fecha: 2020.07.20
10:30:16 +02'00'

Fdo. Mercedes Fernández Moreno

RODRIGUEZ BELMONTE
MARIA ESTHER - DNI
32776974L

Firmado digitalmente por RODRIGUEZ BELMONTE MARIA ESTHER - DNI 32776974L
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=UNIVERSIDAD DE A CORUÑA, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, ou=BIOLOXIA, ou=6682, serialNumber=IDCES-32776974L, sn=RODRIGUEZ BELMONTE, givenName=MARIA ESTHER, cn=RODRIGUEZ BELMONTE MARIA ESTHER - DNI 32776974L
Fecha: 2020.07.22 09:19:59 +02'00'

Índice

Resumen / Resumo / Abstract	1
1. Antecedentes y estado actual de la cuestión.....	4
1.1. La osteoartritis (OA).....	4
1.1.1. Relevancia socioeconómica de la OA	6
1.1.2. Papel de la mitocondria y el ADN mitocondrial (ADNmt) en la OA.....	7
1.2. Metabolismo	8
1.2.1. Relevancia del metabolismo de la glucosa en la OA	9
1.3. Desarrollo de un modelo celular <i>in vitro</i> para el estudio de la patología artrósica	11
2. Hipótesis.....	12
3. Objetivos	12
4. Metodología	13
4.1. Cultivo celular	13
4.1.1. Condiciones de cultivo	13
4.2. Metodología correspondiente al objetivo 1 – Evaluación del estatus mitocondrial	14
4.2.1. Cuantificación del número de copias de ADNmt	14
4.2.2. Estudio de la red mitocondrial.....	16
4.2.3. Análisis de la biogénesis.....	17
4.2.4. Niveles de producción especies reactivas de oxígeno (O ₂ ⁻) mitocondrial	19
4.3. Metodología correspondiente al objetivo 2 – Estudio del metabolismo celular	19
4.3.1. Análisis de los metabolitos presentes en el medio de cultivo.....	19
4.3.2. Estudio de la capacidad glucolítica	21
4.3.3. Análisis de la función mitocondrial	23
4.4. Limitaciones	25
5. Plan de Trabajo.....	26
6. Cuestiones éticas.....	26
7. Aplicabilidad	27
8. Plan para la difusión de los resultados.....	27
9. Recursos necesarios	28
9.1. Infraestructura necesaria en aparatos y servicios	28
9.2. Fungibles necesarios (Con estimación aproximada de su coste).....	29
10. Bibliografía	31
10.1. Bibliografía citada en el proyecto	31
10.2. Otra bibliografía consultada para elaborar el proyecto.....	34

Resumen / Resumo / Abstract

Resumen

La osteoartritis (OA) es una de las enfermedades musculoesqueléticas más prevalentes a nivel mundial, sin embargo, su patogenia es compleja y a día de hoy no está clara. En los últimos años se ha puesto de manifiesto el papel de la mitocondria en la OA, así como el papel de los haplogrupos de ADNmt en su incidencia y progresión. La mitocondria es un orgánulo celular que desempeña una función esencial en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos. La concentración de glucosa tiene un efecto sobre el metabolismo celular y la OA ya que altas concentraciones se relacionan con una mayor producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Se ha descrito que los condrocitos sanos son células altamente glucolíticas, aunque obtienen un 25% del ATP por la vía mitocondrial y tienen la flexibilidad metabólica necesaria para adaptarse a los cambios de metabolitos, lo que no ocurre en condrocitos OA. La utilización de un modelo celular *in vitro* se presenta como una herramienta útil para estudiar de forma simple el papel de la mitocondria en numerosas patologías complejas como la OA. Así, el objetivo de este proyecto es estudiar si la glucosa podría tener un papel modulador en la respuesta mitocondrial en un modelo celular *in vitro* basado en híbridos transmitocondriales portadores de mitocondrias sanas y artrósicas. Para ello, se evaluará el estatus mitocondrial, por un lado, analizando el número de copias de ADNmt y la biogénesis mitocondrial y, por otro, analizando la red mitocondrial y los niveles de producción de ERO utilizando MitoTracker Red y MitoSOX respectivamente. Dada la importancia del metabolismo, también se analizarán las concentraciones de tres metabolitos esenciales: la glucosa, el ácido láctico y el piruvato y seguidamente se estudiará la capacidad glucolítica y la función mitocondrial utilizando un SeaHorse XFp *Flux Analyzer*. Todo ello, como respuesta a la incubación con diferentes concentraciones de glucosa.

Resumo

A osteoartrite (OA) é unha das enfermidades musculoesqueléticas máis prevaletentes a nivel mundial, con todo, a súa patoxenia é complexa e a día de hoxe non está clara. Nos últimos anos púxose de manifesto o papel da mitocondria na OA, así como o papel dos haplogrupos de ADNmt na súa incidencia e progresión. A mitocondria é un orgánulo celular que xoga unha función esencial no metabolismo da glicosa e dos ácidos graxos. A concentración de glicosa ten un efecto sobre o metabolismo celular e a OA xa que altas concentracións relaciónanse cunha maior produción de Especies Reactivas de Osíxeno (ERO). Describiuse que os condrocitos sáns son células altamente glicolíticas, aínda que obteñen un 25% do ATP pola vía mitocondrial e teñen a flexibilidade metabólica necesaria para adaptarse aos cambios de metabolitos, o que non ocorre nos condrocitos OA. A utilización dun modelo celular *in vitro* preséntase como unha ferramenta útil para estudar de forma simple o papel da mitocondria en numerosas patoloxías complexas como é a OA. Así, o obxectivo deste proxecto é estudar se a glicosa podería ter un papel modulador na resposta mitocondrial nun modelo celular *in vitro* baseado en cíbridos transmitocondriais portadores de mitocondrias sáns e artrósicas. Para iso, avaliarase o estatus mitocondrial, por unha banda, analizando o número de copias do ADNmt e a bioxéneses mitocondrial e, por outro, analizando a rede mitocondrial e os niveis de produción de EROs utilizando MitoTracker Rede e MitoSOX respectivamente. Dada a importancia do metabolismo, tamén se analizarán as concentracións de tres metabolitos esenciais: a glicosa, o ácido láctico e o piruvato e seguidamente estudarase a capacidade glucolítica e a función mitocondrial utilizando un SeaHorse XFp *Flux Analyzer*. Todo iso, como resposta á incubación con diferentes concentracións de glicosa.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is one of the most prevalent musculoskeletal diseases. However, OA pathogenesis is complex and unclear. Nowadays, the role of mitochondria and mtDNA haplogroups have been related to the OA's incidence and progression. Mitochondria is a cellular organelle that plays an essential role in glucose and fatty acids metabolism. Glucose concentration has an impact on cellular metabolism and in OA, high glucose concentrations are associated with an increase in Reactive Oxygen Species (ROS) production. Healthy chondrocytes have been reported as highly glycolytic cells, although they obtain 25% of ATP via mitochondrial pathway and have metabolic flexibility, which does not occur in OA chondrocytes. The use of an *in vitro* cellular model is a useful tool to study the real role of mitochondria in complex diseases as OA. The aim of this project is to study the effect of glucose concentration over the mitochondrial response by using an *in vitro* model based on transmitochondrial cybrids with mitochondria from healthy and OA donors. To obtain this objective, the mitochondrial status will be evaluated, analyzing the mtDNA copy number and mitochondrial biogenesis through Q-PCR. Mitochondrial network and ROS production will be evaluated using MitoTracker Red and MitoSOX respectively. The concentration of three essential metabolites: glucose, lactic acid and pyruvate will be analyzed. The glycolytic capacity and mitochondrial function will be studied using a Seahorse XFp Flux Analyzer. All of these parameters could be evaluated in presence of different glucose concentrations.

1. Antecedentes y estado actual

1.1. La osteoartritis (OA)

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular cuya patogénesis se caracteriza por el estrés celular y la degradación de la matriz extracelular (MEC) iniciada por micro y macro lesiones que conducen a la activación de respuestas de reparación inadecuadas, incluidas las vías proinflamatorias de la inmunidad innata (Kraus et al., 2016).

Las articulaciones sinoviales son órganos constituidos por varios tipos de tejidos organizados de forma que facilitan la movilidad permitiendo que los huesos se articulen entre sí. Estos tejidos son el hueso subcondral, el cartílago articular hialino, la membrana sinovial, los ligamentos cruzados, los meniscos, la cápsula articular, los ligamentos peri-articulares, las bursas y el músculo esquelético que la rodea (Blanco, 2018).

La articulación artrósica se caracteriza 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 músculos. Todas estas estructuras están intercomunicadas e interactúan, por lo que el estudio de la OA no puede centrarse únicamente en el cartílago, sino que debe llevarse a cabo teniendo en cuenta todos los tejidos que forman parte de la articulación (Blanco, 2018). La progresión de la OA es lenta, primero se manifiesta como una alteración molecular y posteriormente se producen alteraciones anatómicas y/o fisiológicas, causando finalmente dolor y pérdida de la función articular (Kraus et al., 2016).

El cartílago articular hialino recubre los huesos en este tipo de articulaciones, amortiguando y minimizando así las fuerzas a las que se somete a los huesos no deformables durante la carga. Este tejido está constituido por un único tipo celular, los condrocitos, que representan un 2-3% del mismo y MEC en un 97-98%. La MEC se compone en un 70-80% de agua y el 20-30% restante corresponde a colágeno tipo II (50%), proteoglicanos (30-35%) y otras proteínas. Es un tejido aneural, avascular y alinfático, por lo que se nutre mediante difusión desde el líquido sinovial en su parte superior o desde el hueso subcondral en su parte más profunda (Dijkgraaf et al., 1995; Poole et al., 2001).

El condrocito, como único tipo celular presente en el cartílago articular adulto, se encuentra ubicado en la unidad funcional del cartílago, el condrón, formado por el condrocito, el espacio que

ocupa dentro de la matriz, denominado laguna y la matriz, cuyos componentes son sintetizados por la propia célula. Estos son células altamente especializadas y son los encargados de mantener un equilibrio entre la síntesis (anabolismo) y la degradación (catabolismo) de macromoléculas de la MEC (Loeser, 2010; Muir, 1995). Durante el proceso artrósico, los condrocitos sufren una modificación fenotípica desencadenando reacciones de estrés metabólico y rompiendo el equilibrio homeostático que conduce a la degradación de la matriz extracelular, disminuyendo su proliferación y aumentando la apoptosis (Blanco & Rego-Perez, 2014; Kraus et al., 2016).

La OA es una enfermedad heterogénea, ya que hay diferentes factores tanto modificables, como el índice de masa corporal (IMC) o la lesión articular, como no modificables como el sexo, la edad o factores genéticos, que interactúan y desempeñan un papel importante en la enfermedad (Fernández-Moreno et al., 2017).

Recientemente la OA ha pasado a dividirse en diferentes fenotipos característicos, entre los que se encuentran el inflamatorio, el asociado al envejecimiento, el metabólico o el relacionado con lesiones previas. Donde cada uno de ellos presenta un origen y una etiopatogenia diferente (Blanco, 2018; Rego-Pérez et al., 2020).

Aunque la patogénesis de la OA no está clara y su naturaleza sea multifactorial, hay evidencias de que la genética juega un papel esencial en la prevalencia y la progresión de la enfermedad. Desde los años 50 se sabe que ciertas formas de la OA están relacionadas con un fuerte componente genético (Stecher, 1941). La genética de la patología es compleja, ya que generalmente no sigue los patrones típicos de herencia mendeliana y está asociada a la interacción de múltiples genes (Cicutini, 1996).

En los últimos años se han publicado varios estudios de asociación del genoma completo (*Genome-wide association study*, GWAS) desarrollados en la OA que muestran asociación entre numerosos polimorfismos de un solo nucleótido (*Single nucleotide polymorphism*, SNPs) y la patología, pero de todos ellos, aún no se ha conseguido discernir cuáles son aquellos que se pueden asociar estrechamente con la patología (Jeffries, 2019). Del mismo modo, hay que tener en cuenta que los factores ambientales (epigenética) también juegan un papel importante de forma que las interacciones genético-epigenéticas contribuyen a la compleja patogénesis de la OA (Rego-pérez et al., 2020; Snochowska et al., 2017).

1.1.1. Relevancia socioeconómica de la OA

Hoy en día, la OA es una de las enfermedades musculoesqueléticas más prevalentes a nivel mundial, se estima que hay aproximadamente un total de 250 millones de personas en todo el mundo que padecen esta enfermedad (Vos et al., 2012).

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 comunes por delante de las enfermedades cardíacas y respiratorias. El estudio de prevalencia de las enfermedades reumáticas en población adulta en España (EPISER) de 2016, llevado a cabo por la Sociedad Española de Reumatología con el objetivo de estimar la proporción de individuos que presentaban diversas enfermedades reumáticas en España, estimó que el 19,16% de la población española mayor de 40 años presenta la enfermedad, y reflejó que su frecuencia era distinta según el tipo de articulación.

La Liga Reumatológica Galega, recoge que el 23% de población padece algún síntoma relacionado con enfermedades reumáticas. Además, su prevalencia aumenta con la edad, siendo de hasta el 95% en personas mayores de 65 años y se prevé que en 30 años el número de casos será el doble (Blanco et al., 2011).

La OA tiene un gran impacto en la calidad de vida y capacidad funcional de los afectados, es una patología altamente incapacitante, provocando más discapacidad en los mayores que cualquier otra enfermedad (Blanco, 2018; Hiligsmann et al., 2013). Actualmente, no hay un tratamiento eficaz que limite la progresión de la enfermedad, sino que los tratamientos disponibles se centran en paliar los síntomas, principalmente el dolor y, en última instancia se recurre al remplazo articular (Blanco et al., 2011).

Como resultado de esto, la OA supone un importante impacto socioeconómico. Así, el coste médico y el impacto de la OA alcanza aproximadamente el 1-2,5% del producto interior bruto (PIB) de un país (Glyn-Jones et al., 2015; Kingsbury et al., 2014).

En España, este gran gasto socio-sanitario repercute tanto a nivel del Sistema Nacional de Salud como para el sector profesional y empresarial, llegando a alcanzar un coste de 5 millones de euros anuales, lo que supone un 0,5% del PIB nacional.

1.1.2. Papel de la mitocondria y el ADN mitocondrial (ADNmt) en la OA

Como se describía anteriormente, existe una asociación entre el genoma nuclear y la OA. Además, en los últimos años se ha visto que no solo este genoma está relacionado con la patología, sino que el ADN mitocondrial (ADNmt) también juega un papel esencial en su progresión, así estudios publicados por el Grupo de investigación en Reumatología (GIR) han puesto de manifiesto la asociación entre los haplogrupos de ADNmt y la patología (Blanco et al., 2011; Fernández-Moreno et al., 2017; Rego-Pérez et al., 2008)

Las mitocondrias son orgánulos celulares que, además de ser la principal fuente de producción de energía en forma de ATP de la célula, también participan en otros numerosos procesos celulares, como la señalización celular, la muerte celular, el control del ciclo celular, el crecimiento celular y el metabolismo (Pinto & Moraes, 2016).

Estos orgánulos contienen su propio material genético, el ADNmt, que consiste en una molécula circular de doble cadena y superenrollada que codifica para 37 genes. La mayor parte del genoma mitocondrial es codificante, solo hay una pequeña porción no codificante llamada D-loop que es esencial para la transcripción y la replicación del ADNmt (Pinto & Moraes, 2016). Aunque la mayor parte de las proteínas mitocondriales se encuentran codificadas en el ADN genómico y son importadas a la mitocondria, algunos de los componentes de la CTE están codificados por genes mitocondriales, a excepción del complejo II (Mueller et al., 2012).

El ADNmt se hereda por vía materna y presenta una tasa mayor de mutación que el ADN genómico debido a su proximidad a la cadena de transporte de electrones que es la mayor fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), que carece de histonas como tales y a la ausencia de un sistema de reparación eficaz. Debido a esto, a lo largo de la evolución humana se han ido acumulando mutaciones puntuales que han dado lugar a lo que se denominan haplogrupos de ADNmt, definidos por la presencia de SNPs que se heredan en conjunto. Estas mutaciones se han adquirido a lo largo de la historia humana conformándose por selección climática cuando los humanos, procedentes de África, migraron hacia climas más fríos (Torroni et al., 1994; Wallace, 1994).

Los diferentes haplogrupos de ADNmt condicionan que la mitocondria tenga un funcionamiento diferente, así se han asociado con diferencias en el rendimiento en la fosforilación oxidativa,

consumo de energía y producción de calor, niveles de producción de EROs y eficiencia metabólica (Gómez-Durán et al., 2010; Ruiz-Pesini et al., 2000).

Todo esto ha llevado a que exista una relación entre determinados grupos de ADNmt y una mayor incidencia de ciertas enfermedades multifactoriales, entre las que se encuentran enfermedades metabólicas, como la diabetes tipo 2, neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson, o cáncer (Mueller et al., 2012).

A estas enfermedades se suma la OA, ya que, aunque los condrocitos se consideraban hasta hace unos años células altamente glucolíticas, hoy en día se sabe que obtienen aproximadamente el 25% del ATP de la mitocondria y hay numerosas evidencias de que la mitocondria posee un papel regulador en la OA y de que existe una asociación entre los haplogrupos de ADNmt y la prevalencia, incidencia y progresión de la OA en diferentes cohortes mundiales (Blanco et al., 2018).

1.2. Metabolismo

El metabolismo celular se compone de numerosas rutas organizadas simultáneamente cuyo objetivo es cubrir las necesidades y el requerimiento energético para la supervivencia celular. La mitocondria desempeña un papel fundamental en el metabolismo ya que es el orgánulo celular donde el carbono es oxidado por el O₂ para obtener energía en forma de ATP. El carbono es originado principalmente a partir de dos vías metabólicas, la de la glucosa y la de los ácidos grasos (Mueller et al., 2012). El metabolismo energético normal de una célula se caracteriza por cambios periódicos en la oxidación de glucosa (glucólisis y ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT)) y de los ácidos grasos (β -oxidación), ya que la maquinaria mitocondrial responsable de la combustión del carbono cambia entre metabolitos en función de las circunstancias fisiológicas y nutricionales (Muoio, 2014).

El metabolismo de la glucosa tiene lugar en dos fases que se dan en dos compartimentos celulares diferentes. La primera fase se denomina glucólisis, se produce en el citoplasma celular y consiste en la degradación de la glucosa hasta dos moléculas de piruvato. En la segunda fase, las moléculas de piruvato migran a la mitocondria, donde, a través de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), se transforman en Acetil-CoA. Este compuesto se incorpora a continuación al CAT generando CO₂ y poder reductor (NADH y FADH₂) que se utilizarán posteriormente como sustratos en la

Cadena de Transporte de Electrones (CTE) para producir energía mediante el acoplamiento de esta con la fosforilación oxidativa (Liemburg-Apers et al., 2015).

Durante este proceso se genera la mayor parte de especies reactivas de oxígeno (ERO) a nivel celular, debido a la fuga de electrones de la CTE y la reducción parcial del oxígeno molecular, lo que puede causar daño oxidativo tanto en la mitocondria como en el resto de la célula (Blanco et al., 2011). En condiciones normales, la producción de ERO en el interior celular se relaciona con la 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. La célula dispone de un sistema de enzimas detoxificadoras que actúan cuando se produce un incremento en la generación de ERO, eliminándolos (Murphy, 2009; Scarpulla, 2012). El estrés oxidativo refleja un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad de eliminación de estos. Asimismo, se ha descrito una relación entre los niveles de ERO y la absorción y el metabolismo de la glucosa, dándose una regulación positiva bidireccional entre ambos procesos (Liemburg-Apers et al., 2015).

1.2.1. Relevancia del metabolismo de la glucosa en la OA

La glucosa, como se ha descrito anteriormente, es un importante combustible metabólico y también es un precursor estructural en el cartílago, ya que juega un papel importante en la síntesis de la MEC. Los condrocitos obtienen energía principalmente de la glucólisis, aunque también utilizan la fosforilación oxidativa y poseen la capacidad de utilizar otros combustibles metabólicos y fuentes de energía. Los condrocitos de pacientes sanos son capaces de responder a cambios de demanda nutricional, fenómeno que se denomina flexibilidad metabólica. Sin embargo, en pacientes con OA no se da esta flexibilidad metabólica en condrocitos (Dalmao-Fernández et al., 2020; Mobasheri et al., 2017).

Las células regulan la captación de glucosa mediante transportadores de glucosa (GLUT). Los GLUT se expresan de una manera altamente específica de tejido y muestran diferentes características funcionales, lo que permite una regulación específica de tejido de la absorción de glucosa. Los condrocitos modulan la captación de glucosa principalmente a través de GLUT1 cuyos niveles aumentan o disminuyen en respuesta a determinados estímulos como son un ambiente hipóxico, donde aumenta su concentración para obtener mayor cantidad de glucosa e

incrementa el flujo de glucólisis, la presencia de citoquinas proinflamatorias, o el aumento de la concentración de glucosa (Mobasheri et al., 2017).

Al cultivar condrocitos a distintas concentraciones de glucosa se observó que, a altas concentraciones de glucosa, los condrocitos normales son capaces de modular la síntesis y degradación de GLUT1 para adaptarse a los cambios, a diferencia de los condrocitos OA, lo que da lugar a la acumulación de glucosa intracelular y el consiguiente aumento en la producción de ERO (Rosa et al., 2009). De igual modo, en un estudio en queratinocitos se observó que el cultivo celular a bajas concentraciones de glucosa disminuía la producción de ERO, mientras que altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo da lugar a la producción excesiva tanto de O_2^- como de H_2O_2 además de disminuir los niveles de enzimas detoxificadoras contribuyendo a la progresión del estrés oxidativo. También se asoció el exceso de producción de ERO con la disfunción mitocondrial, caracterizada por la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), aumento de la masa mitocondrial, alteración de los complejos respiratorios mitocondriales, liberación del citocromo c (Cyt c), disminución del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y aumento de la fragmentación del ADNmt (Rizwan et al., 2020).

Otro efecto que puede tener la glucosa sobre el metabolismo celular es el efecto Crabtree, que consiste en la represión de OXPHOS en condiciones de alta concentración de glucosa, produciéndose un cambio a metabolismo fermentativo (Wojtczak, 1996). En el metabolismo básico del cartílago articular el efecto Crabtree tiene un papel regulador importante dado que la glucosa presente en la membrana sinovial reduce el consumo de glucosa por parte de la capa superficial del cartílago que se encuentra bien nutrida, de forma que se produce una compensación oxidativa con la disminución de las tasas de glucólisis en la zona profunda. Además, estudios realizados en cartílago porcino mostraron una estrecha correlación entre el consumo de oxígeno y la concentración y el consumo de glucosa (Mobasheri et al., 2008).

Dadas estas evidencias podemos afirmar que la concentración de glucosa tiene un efecto importante sobre el metabolismo celular, lo que ha hecho que recientemente los investigadores se planteen si la glucosa presente en el medio de cultivo podría estar afectando a la respuesta celular y, por tanto, dificultando la interpretación de los resultados obtenidos experimentalmente.

1.3. Desarrollo de un modelo celular *in vitro* para el estudio de la patología artrósica

Para estudiar la contribución del ADNmt a distintas patologías es necesario disponer de un modelo celular *in vitro* que permita estudiar la función real de los polimorfismos del ADNmt bajo un mismo fondo nuclear. Los cíbridos transmitocondriales son líneas celulares eucariotas generadas tras la fusión de una célula carente de ADNmt (células *Rho-0*) con células donadoras de ADNmt, que son carentes de núcleo, pero portadoras del ADNmt que se quiere estudiar (Sazonova et al., 2018).

Los cíbridos representan un herramienta muy útil a la hora de investigar patologías complejas como el Parkinson, el Alzheimer o el cáncer, en las que *a priori* no parece que la mitocondria pueda estar implicada, sin embargo, son numerosos los estudios que han puesto de manifiesto la asociación entre ambas mediante el uso de este modelo celular, destacando así el papel que juega la mitocondria en todas ellas y aportando información útil a la hora de conocer, estudiar y buscar terapias efectivas frente a estas patologías (Sazonova et al., 2018).

Así, gracias a este modelo celular *in vitro* se han podido estudiar numerosas mutaciones patogénicas del ADNmt que incluyen reordenamientos, mutaciones puntuales en el ARNt, en el ARNr y en genes que codifican proteínas. Se ha conseguido estudiar la contribución de la disfunción mitocondrial y las mutaciones de genes de ADNmt a la patogénesis de la OA, así como de otras enfermedades. También resultan útiles para estudiar cómo afectan las variaciones del ADNmt en la patogénesis de una enfermedad al afectar procesos como producción de ERO y la disfunción mitocondrial. Por último, los cíbridos han servido para estudiar interacciones evolutivas entre genomas nucleares y mitocondriales de especies cercanas evolutivamente (Bacman et al., 2020; Dalmao-Fernández et al., 2020).

Todas estas características hacen que los cíbridos sean útiles para estudiar la OA, ya que, por la peculiaridad del tejido afectado, la obtención de cultivos primarios de condrocitos es laboriosa y complicada y dificulta la realización de un número elevado de experimentos (Blanco et al., 2004; Muir, 1995). La realización de estudios en modelos celulares es ampliamente aceptada por la comunidad científica y presenta pocos impedimentos éticos (Geraghty et al., 2014).

Por lo tanto, la utilización de cíbridos que contengan ADNmt procedente de pacientes sanos y OA ofrece una herramienta útil para seguir analizando el papel real de la mitocondria en la OA,

teniendo en cuenta que estos resultados deben ser finalmente replicados en cultivos primarios para que su relevancia biológica sea mayor (Fernández-Moreno et al., 2017).

2. Hipótesis

Teniendo en cuenta el papel que desempeña la mitocondria en el desarrollo de la patología artrósica, que este es un orgánulo clave en la regulación del metabolismo celular y las nuevas evidencias que señalan que los condrocitos artrósicos presentan alteración metabólica, así como una peor flexibilidad metabólica, nos hemos planteado la siguiente hipótesis de trabajo: “La concentración de glucosa podría modular la respuesta mitocondrial en el modelo celular *in vitro* basado en híbridos transmitocondriales portadores de mitocondrias sanas y artrósicas”.

3. Objetivos

Dada la hipótesis planteada, se quiere estudiar el papel que tiene la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre la respuesta mitocondrial en híbridos transmitocondriales. Para ello, nos hemos planteado desarrollar los siguientes objetivos específicos en presencia de diferentes concentraciones de glucosa:

- 1- Evaluar el estatus mitocondrial como respuesta a las diferentes condiciones nutricionales
 - 1.1. Analizar el número de copias de ADNmt
 - 1.2. Estudiar la respuesta de la red mitocondrial
 - 1.3. Analizar la biogénesis mitocondrial
 - 1.4. Estudiar los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (O_2^-) mitocondriales
- 2- Estudiar el metabolismo celular bajo las diferentes concentraciones de cultivo
 - 2.1. Analizar los metabolitos presentes en el medio de cultivo
 - 2.2. Estudiar la glucólisis bajo dos concentraciones de glucosa diferentes
 - 2.3. Analizar la función mitocondrial a través del estudio de OXPHOS

4. Metodología

4.1. Cultivo celular

Los experimentos realizados en el presente proyecto requieren la utilización de una línea celular *in vitro*, los cíbridos transmitocondriales, que habrían sido generados previamente siguiendo la metodología clásica (Chomyn, 1996). Los cíbridos que se utilizarán fueron generados a partir de la fusión de la línea celular de osteosarcoma 143B.TK⁻ carente de ADNmt (*Rho 0*) con plaquetas (células anucleadas) obtenidas de pacientes tanto sanos como patológicos, portadores de dos haplogrupos de ADNmt diferentes, el H y el J, por su diferente asociación con la OA.

4.1.1. Condiciones de cultivo

Condiciones de cultivo estándar

Los cíbridos transmitocondriales crecen en presencia de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma) en cuya composición destacan la glucosa 4,5 gr/L y el piruvato 1 mM y es suplementado con suero bovino fetal (SBF, Gibco) al 10% y Penicilina 100 U/ml y Estreptomicina 100 µg/ml (P/S, Invitrogen). Se mantienen en una estufa de cultivo en condiciones óptimas de crecimiento: 37°C, 5% CO₂ y humedad a saturación.

Cuando los cultivos alcanzan entre 80-90% de confluencia aproximadamente se debe realizar el subcultivo celular. Para lo cual las células serán incubadas con tripsina (Sigma) al 2X tras haber sido retirado en DMEM y lavadas con salino. A continuación, las células se centrifugan para poder contar las células en una cámara de Neubauer, permitiendo calcular el volumen de la disolución necesario para cultivar un número determinado de células en la nueva superficie de cultivo.

Periódicamente se llevará a cabo la congelación de cíbridos para disponer de un reservorio de células en nitrógeno líquido (N₂), esto se llevará a cabo en un criovial donde las células se resuspenderán en medio de congelación (dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) al 10% en SBF).

Condiciones de cultivo para realizar los experimentos

Como se describió anteriormente los cíbridos se crecerán en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Por lo que se preparan los diferentes medios de cultivo como se detalla a continuación:

- DMEM con una alta concentración de glucosa de 4.5gr/l
- DMEM con baja concentración de glucosa, 1 gr/l

- DMEM sin glucosa

Todos ellos llevarán piruvato 1 mM y P/S y serán suplementados al 10% con SBF

Las células serán incubadas en los diferentes medios 24, 48, 72 y 96 horas (h) con el fin de establecer el tiempo de cultivo óptimo para desarrollar cada experimento.

4.2. Metodología correspondiente al objetivo 1 – Evaluación del estatus mitocondrial

4.2.1. Cuantificación del número de copias de ADNmt

Extracción de ADN

Se extraerá el ADN total de las células en cultivo con el *mini kit QIAamp DNA* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este método está basado en la adhesión del ADN a un filtro de sílice en fase sólida y su posterior elución.

Para la obtención de ADN se deben obtener previamente 1×10^6 células utilizando tripsina, como se describió anteriormente y una tras su centrifugación y eliminación del medio y la tripsina, se añade proteinasa K y tampón de lisis y se incuban a 57°C durante 5 minutos (min). Posteriormente se añade tampón de adhesión y se agita. Esta solución se añade a una columna insertada dentro de un tubo de 2 mL (suministrada por el kit) y se centrifuga. Posteriormente, se realizarán dos lavados con tampón de lavado y una centrifugación en vacío para eliminar los restos de tampón de lavado. Después, se coloca el filtro en un nuevo tubo y se añade tampón de elución que tras incubarlo 1 min se centrifuga obteniendo el ADN resuspendido en el mismo.

La muestra de ADN será cuantificada en un NanoDROP ND-100 a una longitud de onda (λ) de 260 nanómetros (nm) que nos indicará la concentración de ADN presente en la muestra en ng/ μ l, su pureza y su integridad.

Determinación del número de copias de ADNmt mediante PCR a tiempo real (Q-PCR)

El número de copias de ADNmt se estimará realizando una PCR en tiempo real (Q-PCR) en la que se cuantificarán dos genes diferentes: el gen ribosómico mitocondrial 12S (*12S-rRNA*) y el gen nuclear *RNaseP* utilizando *Sybr Green I Master* (Roche Diagnostics), un fluoróforo que se une al ADN de doble cadena de forma inespecífica emitiendo fluorescencia, para posteriormente calcular un ratio 12S-rRNA /RNAsaP que dará una estima del número de copias de ADNmt presentes en la muestra.

La preparación de la muestra se realizará como se describe en la **Tabla 1**. Todas las muestras de ADN se analizarán por duplicado. La reacción tendrá lugar en un LightCycler® 480 II (Roche) de 96 pocillos, un termociclador que proporciona los ciclos de temperatura necesarios para que se desarrolle la PCR (descritos en la **Tabla 2**) y presenta un sistema de detección que es capaz de detectar y cuantificar la señal emitida por el fluoróforo para ciclo de amplificación. Tras la amplificación se realizará un análisis de la curva de *Melting* para determinar la especificidad de las reacciones llevadas a cabo.

Tabla 1. Componentes necesarios para preparar la mezcla de PCR

Reactivo	Volumen
ADN	50 ng
LightCycler1480 Sybr Green I Master (Roche)	10 µL
Cebadores 20 µM	0,3 µL (de cada uno)
Agua	Hasta completar volumen
Volumen final	20 µL

Tabla 2. Ciclos térmicos de amplificación para el desarrollo de la q-PCR

Paso	Proceso	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	Desnaturalización	1	95°C	1 min
Amplificación	Desnaturalización	50	95°C	10 s
	Hibridación		60°C	15 s
	Extensión		72°C	10 s
Curva de <i>Melting</i>	Desnaturalización	1	65°C	5 s
	Hibridación		65°C	1 min
	*		65-97°C	-

*Aumento progresivo de la temperatura hasta 97°C grado a grado adquiriéndose fluorescencia de forma continua.

s=segundos

Por último, para determinar el número de copias de ADNmt se obtendrán los valores de Ct (ciclo en el que la fluorescencia es detectable), que se extrapolarán a la curva de calibrado previamente elaborada independiente para cada gen (12S-rRNA y RNaseP) y guardada en el equipo. Posteriormente, el número de copias de ADNmt será expresado mediante la relación 12S rRNA / RNaseP.

4.2.2. Estudio de la red mitocondrial

El estudio de la red mitocondrial se realizará utilizando el colorante fluorescente MitoTracker™ Red (Thermofisher) a una concentración de 250 nM y se evaluará mediante el análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal así como mediante citometría de flujo que permite cuantificar la intensidad de la señal.

Este colorante difunde a través de la membrana plasmática y tiñe las mitocondrias activas, permitiendo visualizar la morfología de la red mitocondrial, así como realizar una medida indirecta del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).

En primer lugar, se preparará una solución de *stock* de MitoTracker 1mM diluyendo el colorante en DMSO y en el momento de su utilización se preparará una solución de trabajo a la concentración indicada anteriormente.

Para llevar a cabo esta metodología, cuando las células alcancen una confluencia del 80% aproximadamente, se añadirá el Mitotracker y se incubará durante 30 min a 37°C en oscuridad.

A continuación, si se van a realizar imágenes, las células se fijarán en presencia de paraformaldehído al 4% (Sigma) durante 10 min a temperatura ambiente y, tras varios lavados y una contra-tinción con DAPI (Sigma), se montarán los portas con medio de montaje específico para fluorescencia y se observarán al microscopio, bien en el servicio de histomorfología del INIBIC, o en el caso de necesitar imágenes de microscopía confocal se llevarían a los Servicios de Apoyo a la Investigación de la UDC.

Por otro lado, si se va a realizar la cuantificación mediante citometría, una vez las células hayan sido marcadas como se describió anteriormente, se obtendrá la solución celular utilizando tripsina al 2X y, tras centrifugar, se obtiene el precipitado celular que se resuspende en tampón salino en un tubo de citómetro. Las células se pasan a continuación por el citómetro de flujo FACsCalibur (Becton Dickinson) y los datos se analizan mediante el software BD CellQuest™ Pro (Becton Dickinson).

4.2.3. Análisis de la biogénesis

Extracción de ARN

Se extraerá el ARN total de las células en cultivo utilizando Trizol® (Invitrogen), un reactivo monofásico consistente en fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes que facilitan el aislamiento del ARN.

Las células se homogenizarán en presencia del reactivo, lo cual rompe las uniones entre las células y el sustrato, lisa las células y proporciona estabilidad al ARN. A continuación, se añade cloroformo que, tras centrifugar, separa la solución en dos fases, acuosa y orgánica. La fase acuosa, que es la que contiene el ARN se transfiere a un nuevo tubo donde es tratada con isopropanol que precipita el ARN. Por último, se realiza un lavado con etanol al 70% frío y se resuspende el ARN en agua.

La muestra de ARN será cuantificada en un NanoDROPO ND-100 a una λ de 230 nm obteniendo así la concentración de ARN presente en la muestra en ng/ μ l.

Retrotranscripción

El ARN obtenido se retrotranscribirá a ADN complementario (ADNc) utilizando NZY *First-Strand cADN Synthesis Kit* (nzytech) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El kit incluye una mezcla de cebadores de seis nucleótidos con secuencias generadas al azar que se unirán al ARNm de forma aleatoria y oligos dT que se unirán a la cola poliA característica del ARN mensajero (ARNm).

El procedimiento comenzará añadiendo *NZRYT 2X Master Mix* y *NZRYT Enzyme Mix* sobre la muestra de ARN para después incubar primero, durante 10 min a 25°C, a continuación, durante 30 min a 50°C y, finalmente, durante 5 min a 85°C. Por último, se añade *NZY RNase H* que se incuba durante 20 min a 37°C para eliminar los restos de ARNm.

Q-PCR

La Q-PCR es un método muy útil para estudiar la expresión génica ya que permite la detección y cuantificación en tiempo real del producto de PCR. La Q-PCR es una variante de la PCR convencional donde se añade una sonda marcada con un fluoróforo que se unirá de forma específica a las moléculas de ADN generadas por PCR. Se utilizará para ello sondas UPL

(*Universal Probe Library*), que son sondas de 8-9 nucleótidos de tipo *taqman*, que emiten fluorescencia cuando se unen a una secuencia específica de ADN.

En los objetivos del presente trabajo se planteó analizar la expresión génica de genes implicados en la biogénesis mitocondrial como son: *PPARGC1A* (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha). *TFAM* (Transcription Factor A, Mitochondrial) y *NRF1* (Nuclear Respiratory Factor 1). También se requiere el análisis de un gen de referencia cuya expresión sea constante e invariable en todas las muestras, en este caso se utilizarán dos: *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) y *RPL13A* (*Ribosomal Protein L13a*).

La mezcla de reacción se describe en la **Tabla 3** a la que se le añadirán 2 μ L de ADNc de cada muestra que se cargarán por duplicado. Los cebadores que se utilizarán ya han sido previamente diseñados utilizando la página web de Roche y Universal Probe Library. El proceso tendrá lugar en un LightCycler® 480 II (Roche) de 96 pocillos y el programa utilizado es el descrito en la **Tabla 4**.

Tabla 3. Componentes necesarios para preparar la mezcla de PCR

Reactivo	Volumen (μ L)
MasterMix-UPL (Roche)	5
Sonda UPL (Roche)	0,1
Cebadores 20 μ M	0,35 (de cada uno)
Agua	Hasta completar volumen
Volumen final	10

s = segundos

Tabla 4. Ciclos térmicos de amplificación para el desarrollo de la q-PCR

Paso	Proceso	Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización previa	Desnaturalización	1	95°C	2 min
Amplificación	Desnaturalización	30	95°C	45 s
	Hibridación		Tm dependiente de cada par de cebadores	45 s
	Extensión		72°C	30s-1min
Extensión final	Extensión	1	72°C	5 min

De esta forma se obtendrán los datos de Ct, valor que será proporcional a la cantidad de ácido nucleico inicial y se obtendrán los valores de expresión relativa en base a la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada gen utilizando el software Q-Base Plus versión 2.4 (Biogazelle).

4.2.4. Niveles de producción especies reactivas de oxígeno (O_2^-) mitocondrial

Los niveles de producción de anión superóxido (O_2^-) mitocondrial se medirán mediante citometría de flujo utilizando el reactivo MitoSOX® Red (Molecular Probes, Invitrogen). Este reactivo penetra en las células vivas dirigiéndose a las mitocondrias y es oxidado por el anión superóxido (O_2^-) emitiendo fluorescencia roja al unirse a los ácidos nucleicos.

En primer lugar, debe prepararse el reactivo, diluyéndolo en DMSO (Sigma) estéril hasta una concentración de 5 mM. Después, esta solución se diluye en *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, Lonza) sin calcio ni magnesio en una proporción de 0,5 μ L de MitoSOX® por 500 μ L de HBSS.

El reactivo diluido se añade a la placa de cultivo tras haber retirado el medio donde crecían las células y se incuba durante 30 min a 37°C en oscuridad. Después, se obtienen las células con tripsina al 2X y se resuspenden en tampón salino. De esta forma, las células estarán listas para pasar por el citómetro citómetro FACsCalibur (Becton Dickinson).

La fluorescencia del fluoróforo es captada en el canal FL-2 y la intensidad de la fluorescencia se relaciona directamente con los niveles de anión superóxido presente en las células. Los datos se analizarán utilizando el software BD CellQuest™ Pro (Becton Dickinson).

4.3. Metodología correspondiente al objetivo 2 – Estudio del metabolismo celular

4.3.1. Análisis de los metabolitos presentes en el medio de cultivo

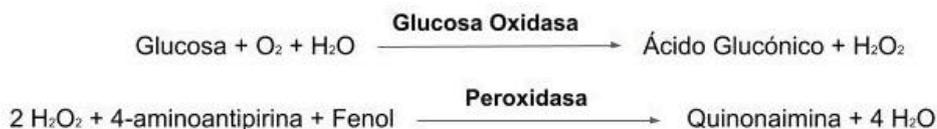
Determinación del consumo de glucosa y producción de ácido láctico

Se determinará el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico mediante la medida de su presencia en el medio de cultivo a través del uso de kits comerciales específicos para cada parámetro.

El procedimiento comenzará en ambos casos sembrando 8×10^4 células en una placa multipocillo de 12 pocillos (MW12) por triplicado en las condiciones a evaluar y se incubarán durante 48 h.

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

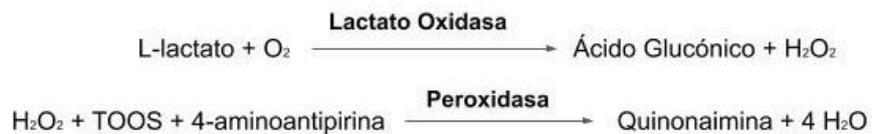
Este parámetro se determinará con el kit *Glucose oxidase* (BioSystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la generación de un compuesto de color rojo cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa en el medio. El proceso tiene lugar en dos reacciones catalizadas por la glucosa oxidasa y la peroxidasa respectivamente, que son las siguientes:



El procedimiento comienza preparando el reactivo de trabajo para cada pocillo mezclando 75 μl de tampón de ensayo, 10 μl de glucosa 2 M, 1 μl de *HRP Enzyme* y 1 μl del reactivo de tinción. De este se transfieren 80 μl a cada pocillo, donde después se añadirán 20 μl de muestra. Para cada condición, habrá un pocillo de blanco donde la muestra será medio de cultivo incubado en ausencia de células, y un pocillo estándar donde la muestra será reactivo estándar.

Determinación de la concentración de ácido láctico presente en el medio de cultivo

Este parámetro se determinará con el kit *L- lactate Trinder liquid* (Biochemical Enterprise), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la degradación del lactato para dar un compuesto de color púrpura cuya concentración será proporcional a la concentración de ácido láctico presente en la muestra. El proceso tiene lugar en dos reacciones descritas a continuación:



Para el análisis se utilizarán tres reactivos: el primero contiene 4-aminoantipirina y peroxidasa, el segundo contiene TOOS y lactato oxidasa y el tercero consiste en el estándar. El reactivo de trabajo se preparará mezclando un frasco de reactivo 1 con un frasco de reactivo 2, suministrados por el kit. Después se utilizará 1 mL de reactivo de trabajo y 0,01 mL de muestra para cada pocillo. Además, para cada condición habrá un pocillo de blanco que contendrá 1 mL de reactivo de trabajo y 1 mL de blanco y, por último, para cada condición habrá un pocillo estándar que contendrá 1 mL de reactivo de trabajo y 0,01 mL de reactivo 3.

Obtención de los resultados

Las concentraciones de glucosa y lactato se determinarán en ambos casos mediante el equipo de análisis bioquímico *A15 BioSystems*, a una λ de 500 y 550 nm respectivamente, se obtendrán los valores de concentración en mg/dl. Los valores obtenidos en los pocillos carentes de células serán sustraídos del resto.

Determinación de la producción de piruvato celular

Se determinará este parámetro mediante el kit *pyruvate assay* (Sigma) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este ensayo se basa en la generación a través de una reacción enzimática, de un producto coloreado cuya intensidad de señal será directamente proporcional a la cantidad de piruvato presente en el medio.

El procedimiento comenzará sembrando 1×10^4 células en una placa multipocillo por triplicado en las condiciones a evaluar que se incubarán durante 48 h. En el momento del ensayo, se lisarán las células con *Pyruvate Assay buffer* y se centrifugarán. Se recogerá el sobrenadante y se añadirá *Assay buffer Pyruvate Probe Solution* y *Pyruvate Enzyme Mix* y se incubará durante 30 min en oscuridad. Para cada condición habrá un pocillo de blanco que será incubado en ausencia de células y un pocillo estándar, incubado en presencia de reactivo estándar.

Se obtendrá la concentración de piruvato midiendo la absorbancia de las muestras por duplicado a una λ de 570 nm y extrapolando este valor a una curva de calibrado incluida en el ensayo.

4.3.2. Estudio de la capacidad glucolítica

Se utilizará un Seahorse Bioscience XF Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience), un equipo que mide la tasa de consumo de oxígeno (TCO) y la tasa de acidificación extracelular (TAC) de células vivas en tiempo real. La TCO y la TAC proporcionan información sobre el proceso de respiración mitocondrial y la glucólisis respectivamente.

Para el estudio de la capacidad glucolítica, se empleará el kit XFp Glycolysis Stress Test (Seahorse Bioscience), que se basa en la acidificación del medio extracelular como consecuencia de la producción de lactato a partir de piruvato.

Para realizar esta metodología se sembrarán 2×10^4 células en una placa multipocillo por triplicado en las condiciones a evaluar y se dejan crecer 24h. La noche previa al inicio del experimento, se

debe hidratar el capuchón de la placa, suministrado por el kit, con *XF Calibrant* e incubar durante toda la noche en una estufa sin CO₂ a 37°C.

El día del ensayo, se preparará el medio del ensayo suplementando el *Seahorse XF Base Medium* con glutamina 2 mM y se ajustará el pH a 7,4. Posteriormente se cargan los puertos del capuchón con los diferentes compuestos que serán inyectados en orden secuencial para poder realizar las medidas de la glucólisis de la forma descrita a continuación:

- **Puerto A:** Contiene Glucosa a una concentración de 10 mM, que va a ser metabolizada hasta piruvato en la ruta de la glucólisis dando lugar a la producción de ATP, NADH, H₂O y protones, acidificando rápidamente el medio extracelular y provocando un incremento de la TAC.
- **Puerto B:** Contiene Oligomicina (Oligo) a una concentración de 2 μM, que es un inhibidor de la enzima ATP sintasa mitocondrial y por lo tanto de la fosforilación oxidativa afectando a la respiración celular y desviando toda la producción de energía hacia la glucólisis, produciendo un aumento de la TAC.
- **Puerto C:** Contiene 2-Deoxi-Glucosa (2-DG) a una concentración de 50 μM, que es un análogo de la glucosa que inhibe la glucólisis por unión competitiva a la hexoquinasa (primera enzima de la vía glucolítica) lo que da lugar a la disminución de la TAC.

El análisis comenzará midiendo la TAC en ausencia de glucosa o piruvato, por lo que esta es debida a procesos independientes de la glucólisis, a continuación, el aparato inyectará al medio extracelular glucosa, lo que produce rápidamente la acidificación del medio debido al metabolismo de la glucosa, que permitirá calcular la tasa de glucosa en condiciones basales. Después, se inyectará la Oligo, lo que afecta a la CTE produciéndose energía mayoritariamente por glucólisis y de esta manera se determina la capacidad glucolítica máxima. Por último, se inyecta se inyecta 2-DG, que da lugar a la disminución de la acidificación del medio, permitiendo calcular la acidificación basal de forma que este parámetro será sustraído a todos los demás (**Figura 1**).

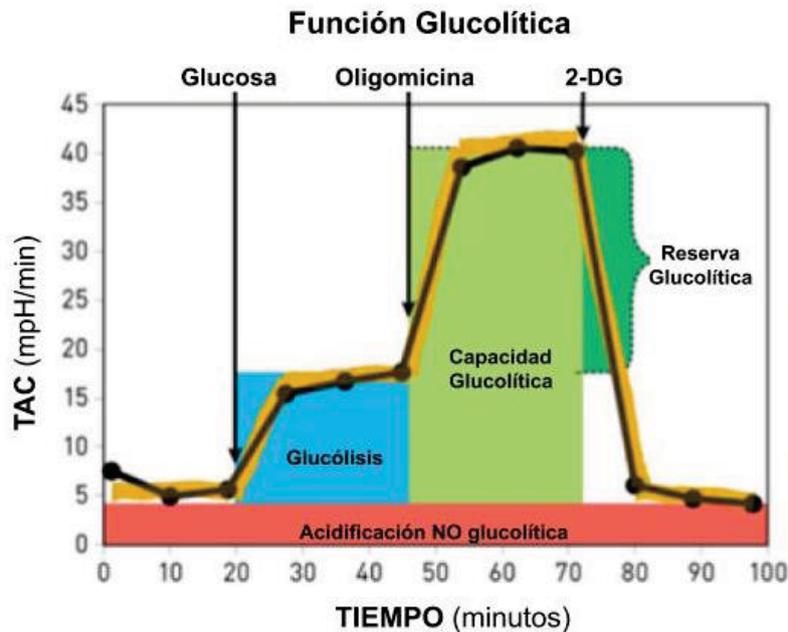


Figura 1. Representación gráfica de los parámetros obtenidos mediante el análisis de la capacidad glucolítica. Se representa el tiempo en el que transcurre el análisis en minutos frente a los valores de TAC obtenidos realizando su medida tras la adición de los diferentes moduladores del proceso glucolítico. La medición de la TAC se realiza obteniendo entre 15 y 20 valores independientes que se utilizan para obtener los parámetros descritos a la derecha de la imagen. Gráfica obtenida y modificada de https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Glycolysis_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf

4.3.3. Análisis de la función mitocondrial

En este caso también se utilizará el *Seahorse Bioscience XF Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience). Para el estudio de la función mitocondrial se empleará el kit *XFp Cell Mito Stress Test*, que mide la TCO.

El inicio será igual que lo descrito en el apartado anterior, a excepción de que en este caso el medio del ensayo será suplementado con glutamina 2 mM, piruvato 1mM y glucosa a 10 mM y ajustando el pH a 7,4. Al ser un kit para analizar la capacidad mitocondrial, los reactivos que se cargarán en los puertos serán:

- **Puerto A:** Contiene Oligo a una concentración de 1,5 μ M, que inhibe la enzima ATP sintasa mitocondrial, lo que desvía la producción de energía hacia la glucólisis, reduciéndose de esta forma el consumo de O_2 .

- **Puerto B:** Contiene carbonil cianuro-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) a una concentración de 1 μM . El FCCP es un compuesto que altera el potencial de membrana mitocondrial, produciendo un incremento de la demanda energética fisiológica forzando el trabajo de la CTE a su máxima capacidad.
- **Puerto C:** Contiene una mezcla de rotenona/antimicina A a una concentración de 0,5 μM , que son inhibidores del complejo I y III de la CTE, respectivamente, inhibiendo el consumo de O_2 por parte de la mitocondria.

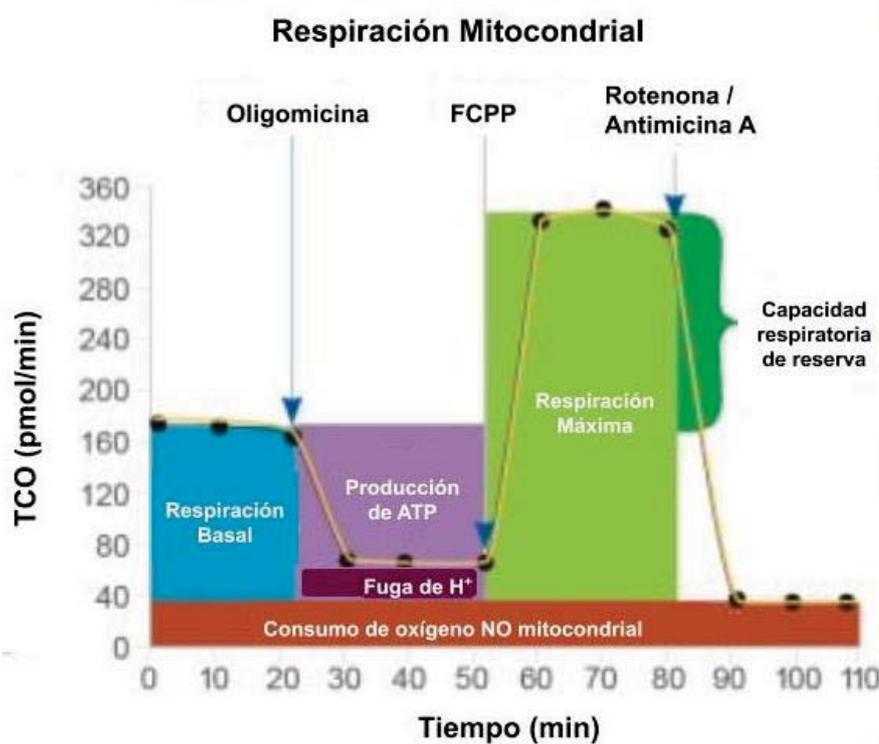


Figura 2. Representación gráfica de los parámetros obtenidos mediante el análisis de la función mitocondrial. Se representa el tiempo en el que transcurre el análisis en minutos frente a los valores de TCO obtenidos realizando su medida tras la adición de los diferentes moduladores de la respiración mitocondrial. Gráfica obtenida de <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-xfp-consumables/kits-reagents-media/seahorse-xfp-cell-mito-stress-test-kit>

El análisis comienza con la medida de la TCO en condiciones basales, a continuación, se añade la Oligo, que produce una reducción de los niveles de TCO, vinculada a la producción de ATP. A continuación, se añade FCCP, que provoca una despolarización de membrana lo que inhibe el acoplamiento de la CTE con la fosforilación oxidativa, haciendo que el TCO aumente al máximo dando un valor asociado con la capacidad máxima respiratoria de la célula. Por último, se inyecta

la mezcla de rotenona/antimicina A, que inhibe la respiración mitocondrial por completo, permitiendo el cálculo de la respiración no mitocondrial, que será sustraída a todos los demás valores. La obtención de estos valores permite también calcular capacidad respiratoria de reserva, que es la diferencia entre la respiración máxima y la basal (**Figura 2**).

4.4. Limitaciones

Las limitaciones que pueden surgir en la metodología descrita son:

- A la hora de realizar los procedimientos hay que poner a punto las condiciones de cultivo y, al someter a las células a restricciones calóricas, estas podrían no responder como se espera y morir, lo que nos haría replantearnos las condiciones descritas, así como los tiempos de incubación.
- Es posible que alguna metodología, pese a que son metodologías puestas a punto en el laboratorio, necesiten ser puestas a punto nuevamente o algún kit tenga que ser remplazado por otro, bien por mala reproducibilidad o porque salga otro al mercado que cubra mejor nuestras expectativas.
- Hay que tener en cuenta las complicaciones que pueden surgir al trabajar con cultivos *in vitro*, y que todos los experimentos deben ser realizados tres veces y en cada una de ellas, por duplicado.
- Una limitación que presenta este proyecto radica en el uso de un modelo *in vitro*, por lo que, si el tiempo fuera suficiente, se replicarían las condiciones óptimas, así como los resultados más prometedores en condrocitos de cultivo primario, de forma que se evada la limitación intrínseca de los trabajos basados únicamente en modelo *in vitro* aproximándonos un poco más al modelo *in vivo*.

5. Plan de Trabajo

El presente proyecto está programado para realizarse en un periodo de seis meses. En la **Tabla 5** se presenta el diagrama de Gantt que recoge la planificación de las diferentes tareas a realizar.

Tabla 5. Diagrama de Gantt.

TAREA	2020 / 2021																								
	MES:	SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE				ENERO		FEBRERO					
	SEMANA:	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Cultivo y crecimiento de cibridos																									
Cuantificación del número de copias de ADNmt																									
Estudio de la red mitocondrial																									
Análisis de la biogénesis																									
Estudio de los niveles de producción de ERO																									
Análisis de los metabolitos presentes en el medio de cultivo																									
Estudio de la capacidad glucolítica																									
Análisis de la función mitocondrial																									
Análisis y valoración de los resultados																									
Desarrollo de las conclusiones																									
Publicación del estudio																									
Presentación del estudio en jornadas y congresos																									

6. Cuestiones éticas

La generación del modelo celular *in vitro* que se utilizará en este proyecto requirió la extracción de plaquetas de pacientes sanos y OA que se obtuvieron de muestras pertenecientes a la colección para investigación de enfermedades reumáticas creada por el Dr. Blanco y registrada en el registro nacional de Biobancos en la sección de colecciones (Código de Registro C.0000424). Todos los donantes firmaron un consentimiento informado donde aparecen recogidos los principales aspectos del proyecto. Posteriormente las muestras fueron anonimizadas y se obtuvo la aprobación

del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de Galicia. Todos los procedimientos se realizarán de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki.

7. Aplicabilidad

El desarrollo del presente trabajo permitirá evaluar y definir las condiciones óptimas de cultivo para analizar de forma correcta el estatus metabólico, así como diversos parámetros relacionados con la mitocondria tanto en el modelo celular *in vitro* planteado como en los condrocitos de cultivo primario, lo que facilitará interpretación de todos los resultados.

Esto nos permitirá conocer el estatus real de la mitocondria en las células. Además, se podría aplicar directamente en condrocitos humanos obtenidos de pacientes con el fin de estudiar en mayor profundidad la asociación descrita entre la mitocondria y la OA, y la OA y el síndrome metabólico o la diabetes, entre otros. De esta forma se podrá analizar si la elevada concentración de glucosa presente en el medio de cultivo enmascara algunos comportamientos celulares y se están perdiendo datos y resultados que puedan ser aplicados en la práctica clínica.

Los análisis en cultivos celulares serían optimizados si se definen unas condiciones de cultivo más próximas a las que se presentan a nivel fisiológico, ya que se haría en un escenario más próximo a lo que sucede *in vivo* y no se enmascararían los resultados, pudiéndose aplicar a la hora de testar posibles moléculas moduladoras de la patología.

8. Plan para la difusión de los resultados

Una vez finalizado el proyecto y analizados los resultados estos serán publicados en una revista que figure en el *Journal Citation Reports* (JCR). Algunas de las revistas candidatas a las que se enviarán los resultados serán *Osteoarthritis and Cartilage* (factor de impacto de 4.879 (2018)) y *Rheumatology* (factor de impacto de 5.149 (2018)), específicas del campo de la reumatología, y, dentro del campo de la biología celular y metabolismo, a *Cells* (Factor de impacto 4.366 (2019)) y *Metabolites* (Factor de impacto 4.097 (2019)).

También se dará difusión de los resultados obtenidos enviando comunicaciones a los congresos que se celebran anualmente en el campo de la artrosis como los organizados por el Colegio Americano de Artrosis (ACR) o el Europeo (EULAR). También se podrán enviar al congreso de

la Sociedad Mundial de Mitocondria (*Targeting Mitochondria*) al que los integrantes del GIR asisten todos los años.

Dentro de la difusión a nivel local, los resultados serán presentados en alguna de las *Happy Hour* organizadas por la Agrupación Estratégica CICA-INIBIC.

9. Recursos necesarios

9.1. Infraestructura necesaria en aparatos y servicios

Este proyecto se desarrollará en los laboratorios de investigación del INIBIC donde se encuentra el equipamiento citado en el apartado 5 correspondiente a la metodología. También serán utilizados los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña con el objetivo de obtener imágenes mediante microscopia confocal (Nikon AR-1).

El INIBIC está estructurado en diferentes áreas y se tendrá acceso a todas ellas. En la **Tabla 6** se describen las áreas y los equipos presentes en ellas que serán utilizados para el desarrollo del presente proyecto.

Tabla 6. Áreas y equipos necesarios para el desarrollo del proyecto

ÁREAS	EQUIPAMIENTO
Cultivos celulares	Campanas de flujo laminar
	Incubadores
	Centrífugas
	Resto de material necesario para el desarrollo de experimentos de cultivo celular (reactivos, suplementos, etc.)
Histomorfología	Microscopio de fluorescencia Olympus (Olympus Life Sciences).
Citometría	Citometro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson)
	Software BD CellQuest™ Pro (Becton Dickinson)
Biología celular	SeaHorse XFp <i>Extracellular Flux Analyzer</i> (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies)
Genómica	Termocicladores estándar
	LightCycler 480-II (Roche)
Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI)	Microscopio confocal (Nikon AR-1)

9.2. Fungibles necesarios (Con estimación aproximada de su coste)

El presupuesto total para la realización del presente trabajo aparece detallado en la **Tabla 7**. En ella aparecen los recursos necesarios para el desarrollo de cada objetivo planteado y los costes estimados para el desarrollo tanto de la metodología, del plan de difusión, así como el 21% para los gastos generales.

Tabla 7. Recursos necesarios y su coste estimado en euros.

Recursos	Coste estimado en euros
Cultivo celular	
DMEM (Sigma)	7.500
DMSO (Sigma)	
P/S (Invitrogen)	
SBF (Gibco)	
Tampón salino	
Tripsina (Sigma)	
Glucosa	
Piruvato	
Material necesario para cultivo celular	
Uso del cuarto de cultivos	
Objetivo 1 – Evaluación del estatus mitocondrial	
Número de copias de ADN mitocondrial	
Kit para la extracción de ADN (Qiagen)	1.700
Sybr Green I Master (Roche)	
Cebadores	
Material Fungible	
Uso del LightCycler 480	
Red mitocondrial	
Paraformaldehido al 4% (Sigma)	1.850
DAPI (Sigma)	
Mitotracker Red (Thermofisher)	
Tubos de citómetro	
Material para cultivo celular	
Uso del área de citometría	
Uso del área de histomorfología	
Uso del SAI	
Estudio de la biogénesis mitocondrial	
Trizol® (Invitrogen)	3.500
Cloroformo (Sigma)	
Isopropanol (Sigma)	
Glicogen (Thermofisher)	
Etanol (Merk)	
<i>NZY Firs-Strand cDNA Syntesis Kit (nzytech)</i>	

MasterMix-UPL (Roche)	
Sondas UPL (Roche)	
Cebadores	
Material fungible	
Uso del LightCycler 480	
Estudio de producción de especies reactivas de oxígeno O₂⁻	
MitoSOX® Red (Molecular Probes, Invitrogen)	950
HBSS (Lonza)	
Material fungible	
Uso del área de citometría	
Objetivo 2 – Estudio del metabolismo celular	
Estudio de los metabolitos presentes en el medio de cultivo	
Kit <i>Glucose oxidase</i> (BioSystems)	1.800
Kit <i>L- lactate Trinder liquid</i> (Biochemical Enterprise)	
Kit <i>pyruvate assay</i> (Sigma)	
Material fungible	
Uso de lector de absorbancia	
Estudio de la capacidad glucolítica	
Kit XFp Glycolysis Stress Test (Seahorse Bioscience)	629,50
Material fungible	
Uso del Seahorse Bioscience XF Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience)	
Análisis de la función mitocondrial	
Kit <i>XFp Cell Mito Stress Test</i>	565,50
Material fungible	
Uso del Seahorse Bioscience XF Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience)	
Servicios del SAI	
Uso del microscopio confocal Nikon AR-15	49,88
Plan de difusión	
Publicación en una revista JCR	2.750
Asistencia a 1 congreso internacional	1.500
Gastos generales (21%)	
Gastos generales	4.786,92
Total del presupuesto	27.581,80

10. Bibliografía

10.1. Bibliografía citada en el proyecto

- Bacman, S. R., Nissanka, N., & Moraes, C. T. (2020). Cybrid technology. In *Methods in Cell Biology*, 155, 415–439. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.025>
- Blanco, F. J. (2018). La artrosis y la aterosclerosis de la articulación. *Reumatología Clínica*, 14(5), 251–253. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.08.001>
- Blanco, F. J., López-Armada, M. J., & Maneiro, E. (2004). Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion*, 4(5-6), 715–728. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.022>
- Blanco, F. J., Rego, I., & Ruiz-Romero, C. (2011). The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(3), 161–169. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.213>
- Blanco, F. J., Valdes, A. M., & Rego-Pérez, I. (2018). Mitochondrial DNA variation and the pathogenesis of osteoarthritis phenotypes. *Nature Reviews Rheumatology*, 14(6), 327–340. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0001-0>
- Blanco, F., & Rego-perez, I. (2014). Is It Time for Epigenetics in Osteoarthritis ? *Arthritis & Rheumatology*, 66(9), 2324–2327. <https://doi.org/10.1002/art.38710>
- Chomyn, A. (1996). Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells. In *Methods in enzymology* 264, 334–339. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)64031-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)64031-2)
- Cicuttini F. M., & Spector, T. D. (1996). Genetics of osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 55(9), 665–667. <https://doi.org/10.1136/ard.55.9.665>
- Dalmao-Fernández, A., Lund, J., Hermida-Gómez, T., Vazquez-Mosquera, M. E., Rego-Pérez, I., Blanco, F. J., & Fernández-Moreno, M. (2020). Impaired Metabolic Flexibility in the Osteoarthritis Process: A Study on Transmitochondrial Cybrids. *Cells*, 9(4), 809. <https://doi.org/10.3390/cells9040809>
- Dijkgraaf, L. C., de Bont, L. G. M., Boering, G., & Liem, R. S. B. (1995). The structure, biochemistry, and metabolism of osteoarthritic cartilage: A review of the literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 53(10), 1182–1192. [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(95\)90632-0](https://doi.org/10.1016/0278-2391(95)90632-0)
- Fernández-Moreno, M., Soto-Hermida, A., Vázquez-Mosquera, M. E., Cortés-Pereira, E., Relano, S., Hermida-Gómez, T., Pértega, S., Oreiro-Villar, N., Fernández-López, C., Garesse, R., Blanco, F. J., & Rego-Pérez, I. (2017). Mitochondrial DNA haplogroups influence the risk of incident knee osteoarthritis in OAI and CHECK cohorts. A meta-Analysis and functional study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(6), 1114–1122. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210131>
- Geraghty, R. J., Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., Lovell-Badge, R., Masters, J. R., Meredith, J., Stacey, G. N., Thraves, P., Vias, M., & Cancer Research UK. (2014). Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer*, 111(6), 1021–1046. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>
- Glyn-Jones, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H., & Carr, A. J. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, 386(9991), 376–387. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60802-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60802-3)
- Gómez-Durán, A., Pacheu-Grau, D., López-Gallardo, E., Díez-Sánchez, C., Montoya, J., López-Pérez, M. J., & Ruiz-Pesini, E. (2010). Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences

- between mitochondrial haplogroups. *Human Molecular Genetics*, 19(17), 3343–3353.
- Hiligsmann, M., Cooper, C., Arden, N., Boers, M., Branco, J. C., Luisa Brandi, M., Bruyère, O., Guillemin, F., Hochberg, M. C., Hunter, D. J., Kanis, J. A., Kvien, T. K., Laslop, A., Pelletier, J. P., Pinto, D., Reiter-Niesert, S., Rizzoli, R., Rovati, L. C., Severens, J. L. H., ... Reginster, J. Y. (2013). 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). *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 43(3), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2013.07.003>
- Jeffries, M. A. (2019). Osteoarthritis year in review 2018: genetics and epigenetics. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(3), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.10.004>
- Kingsbury, S. R., Gross, H. J., Isherwood, G., & Conaghan, P. G. (2014). Osteoarthritis in europe: Impact on health status, work productivity and use of pharmacotherapies in five European countries. *Rheumatology (United Kingdom)*, 53(5), 937–947. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket463>
- Kraus, V. B., Blanco, F. J., Englund, M., Karsdal, M. A., & Lohmander, L. S. (2016). Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for Clinical Trials and Clinical Use. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(8), 1233–1241. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.036>
- Liemburg-Apers, D. C., Willems, P. H. G. M., Koopman, W. J. H., & Grefte, S. (2015). Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Archives of Toxicology*, 89(8), 1209–1226. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1520-y>
- Loeser, R. (2010). Age-Related Changes in the Mus. *Clin Geriatr Med.*, 26(3), 371–386. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2010.03.002>
- Mobasheri, A., Bondy, C. A., Moley, K., Mendes, A. F., Rosa, S. C., Richardson, S. M., Hoyland, J. A., Barrett-Jolley, R., & Shakibaei, M. (2008). *Facilitative glucose transporters in articular chondrocytes: Expression, distribution and functional regulation of GLUT isoforms by hypoxia, hypoxia mimetics, growth factors and pro-inflammatory cytokines*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-78899-7>
- Mobasheri, A., Rayman, M. P., Gualillo, O., Sellam, J., Van Der Kraan, P., & Fearon, U. (2017). The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(5), 302–311. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.50>
- Mueller, E. E., Brunner, S. M., Mayr, J. A., Stanger, O., Sperl, W., & Kofler, B. (2012). Functional Differences between Mitochondrial Haplogroup T and Haplogroup H in HEK293 Cybrid Cells. *PLoS ONE*, 7(12), e52367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052367>
- Muir, H. (1995). The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays*, 17(12), 1039–1048. <https://doi.org/10.1002/bies.950171208>
- Muoio, D. M. (2014). Metabolic Inflexibility: When Mitochondrial Indecision Leads to Metabolic Gridlock. *Physiology & Behavior*, 176(1), 1570–1573. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0061-4>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Pinto, M., & Moraes, C. T (2015). Mechanisms linking mtDNA damage and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 85, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.005>

- Poole, A. R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., & Lavery, S. (2001). Composition and structure of articular cartilage: A template for tissue repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1(391 SUPPL.), 26–33. <https://doi.org/10.1097/00003086-200110001-00004>
- Rego-pérez, I., Durán-sotuela, A., Ramos-louro, P., & Blanco, F. J. (2020). Mitochondrial Genetics and Epigenetics in Osteoarthritis. *Frontiers in Genetics*, 10(January), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01335>
- Rego-Pérez, I., Fernández-Moreno, M., Fernández-López, C., Arenas, J., & Blanco, F. J. (2008). Mitochondrial DNA haplogroups: Role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 58(8), 2387–2396. <https://doi.org/10.1002/art.23659>
- Rizwan, H., Pal, S., Sabnam, S., & Pal, A. (2020). High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes. *Life Sciences*, 241(December 2019), 117148. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117148>
- Rosa, S. C., Gonçalves, J., Judas, F., Mobasher, A., Lopes, C., & Mendes, A. F. (2009). 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 Research and Therapy*, 11(3), 1–11. <https://doi.org/10.1186/ar2713>
- Ruiz-Pesini, E., Lapeña, A. C., Díez-Sánchez, C., Pérez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Díaz, M., Urriés, A., Montoro, L., López-Pérez, M. J., & Enríquez, J. A. (2000). Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *American Journal of Human Genetics*, 67(3), 682–696. <https://doi.org/10.1086/303040>
- Sazonova, M. A., Sinyov, V. V., Ryzhkova, A. I., Galitsyna, E. V., Melnichenko, A. A., Postnov, A. Y., Orekhov, A. N., & Sobenin, I. A. (2018). Cybrid Models of Pathological Cell Processes in Different Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 4647214. <https://doi.org/10.1155/2018/4647214>
- Scarpulla, R. C. (2012). Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: Integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(9–10), 1088–1097. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.011>
- Snochowska, A., Szmigielska, P., Brzezińska-Lasota, E., & Tomaszewski, W. (2017). Genetic and Epigenetic Interactions in the Etiopathogenesis of Osteoarthritis. Selected Molecular Factors in OA Etiopathogenesis. *Ortopedia, Traumatologia, Rehabilitacja*, 19(3), 227–237. <https://doi.org/10.5604/15093492.1240791>
- Stecher, R. M. (1941). Heberden's nodes: heredity in hypertrophic arthritis of the finger joints. *Am J Med Sci*, 201, 801–809.
- Torrioni, A., Lott, M. T., Cabell, M. F., Chen, Y. S., Lavergne, L., & Wallace, D. C. (1994). mtDNA and the origin of Caucasians: Identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *American Journal of Human Genetics*, 55(4), 760–776.
- Vos, T., Flaxman, A. D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J. A., Abdalla, S., Aboyans, V., Abraham, J., Ackerman, I., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., Ali, M. K., Almazroa, M. A., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., ... Murray, C. J. L. (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2163–2196.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61729-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61729-2)

Wallace, D. C. (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 8739–8746. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8739>

Wojtczak, L. (1996). The Crabtree effect: A new look at the old problem. *Acta Biochimica Polonica*, 43(2), 361–368. https://doi.org/10.18388/abp.1996_4505

10.2. Otra bibliografía consultada para elaborar el proyecto

BioAssay Systems. (2016). *EnzyChrom™ Glucose Oxidase Assay Kit (EGOX-100): Quantitative colorimetric/fluorimetric glucose oxidase activity determination*. <https://www.bioassaysys.com/datasheet/EGOX.pdf>

La Voz de Asturias. (2019). *Las zonas más afectadas por la artrosis* [Infografía]. <https://www.lavozdeasturias.es/default/2019/01/22/00161548166544963191526/Foto/ge23p26g1-01.jpg>

Labtest Diagnóstica S.A. (2012). *Enzymatic Lactate*. https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/12/Ref_138_EdiOutubro2012_Ref240214_Eng.pdf

Liga Reumatológica Galega. (n.d.). *Las ERYMES en cifras*. https://www.ligareumatologicagalega.es/enfermedades_reumaticas_cifras.html

Molecular Probes™. (2005). *MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator *for live-cell imaging* (M36008)*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp36008.pdf>

Molecular Probes™. (2008). *MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp07510.pdf>

NZYTech. (2020). *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit*. <https://www.nzytech.com/products-services/molecular-biology/rnacdna/cdna-synthesis/cdna-kits/mb125>

Quiagen. (n.d.). *QIAamp DNA Mini Kit*. <https://www.qiagen.com/fr/products/top-sellers/qiaamp-dna-mini-kit>

Roche Diagnostics GmbH. (2017). *LightCycler® 480 Probes Master (Version 11)*. <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/1adec14f-3d87-e711-fbba-00215a9b3428>

Sociedad Española de Reumatología. (n.d.). *Episer 2016: Estudio de prevalencia de las enfermedades reumáticas en población adulta en España*. <https://www.ser.es/episer-2>

Thermo Fisher Scientific Inc. (2016). *Invitrogen™ TRIzol™ Reagent: User guide*. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0016385_TRIzol_Reagent_DNA_Isol_UG.pdf