



Papel de los haplogrupos mitocondriales en la patología artrósica.
Influencia de la selección climática.

Tesis Doctoral

Ángel Soto Hermida

Mayo 2015

Tesis doctoral dirigida por el Dr. Francisco Javier Blanco García y el Dr.
Ignacio Rego Pérez.

Grupo de Genómica – Servicio de Reumatología- Instituto de
Investigación Biomédica de A Coruña.

Los directores de esta tesis doctoral, D. Francisco Javier Blanco García y D. Ignacio Rego Pérez,

CERTIFICAN:

Que D. Ángel Soto Hermida, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Vigo, ha realizado en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), y bajo su dirección, el trabajo “Papel de los haplogrupos mitocondriales en la patología artrósica. Influencia de la selección climática”, el cual, reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firman el presente certificado en A Coruña, a 23 de Marzo de 2015.

Dr. Francisco J. Blanco García
Director

Dr. Ignacio Rego Pérez
Director

Ángel Soto Hermida
Doctorando

D. Isaac Fuentes Boquete, tutor de esta tesis,

CERTIFICA:

Que D. Ángel Soto Hermida, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Vigo, ha realizado en el Servicio de Genómica del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), y bajo su tutela, el trabajo “Papel de los haplogrupos mitocondriales en la patología artrósica. Influencia de la selección climática”, el cual reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en A Coruña, a 23 de Marzo de 2015.

Dr. Isaac Fuentes Boquete

Tutor

A mis padres

A Carolina

“El trabajo ocupará una parte importante de vuestras vidas, y la única manera de sentirse realmente satisfecho es hacer lo que consideras un trabajo genial. Y el único modo de tener un trabajo genial es amar lo que hagas. Si no lo has encontrado aún, sigue buscando. No te conformes.” Steve Jobs

AGRADECIMIENTOS

Durante todo el tiempo que me ha llevado realizar esta tesis han sido muchas las personas que han contribuido en mayor o menor medida a que alcanzara esta meta. Algunas lo han hecho participando directamente en el trabajo y otras muchas lo han hecho con su presencia, siendo tan importantes unas como otras. Por eso espero que me perdonen aquellas que no sean nombradas en estos agradecimientos y por supuesto, pueden darse por agradecidas.

A mis directores de tesis los doctores Francisco Blanco e Ignacio Rego por haber dirigido mi trabajo durante estos años y por haberme ayudado a llegar a este momento. En especial quisiera agradecer al doctor Francisco Blanco el haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo en su grupo así como por la acogida y el trato recibido durante todo este tiempo.

Al resto de los integrantes del grupo de Genómica por haberme soportado durante todo este tiempo: Sara, Merce, María, Estefa y Juan. Han sido muchos días y horas juntos y ellos siempre han estado ahí dándome su apoyo.

No quiero olvidarme tampoco de aquellos compañeros que en su día pasaron por el grupo como estudiantes de prácticas o en estancias temporales como Aida, Rebeca, Iván, Jose y Víctor. Ellos con su simpatía y afecto han hecho más fácil el día a día.

A todo el personal clínico del grupo de reumatología, en especial a Natividad y Carlos, por haberme dado la oportunidad de aprender muchas cosas sobre la labor que realizan a nivel clínico y como funcionan las consultas del hospital y la atención al paciente.

A mis queridas proteómicas, Valentina, Bea, Lucía, Patri y Carolina, porque vosotras formáis parte del espíritu de esta tesis ya que además de vuestro impagable apoyo diario en el laboratorio habéis sido mi familia en Coruña junto con Alex, Dani y Ángel.

A mis compañeros del grupo de Inflamación; Romi, Carlos, Noa y Jesús junto con Mar y Moisés porque vosotros siempre habéis estado ahí todos los días compartiendo vuestra amistad y buen rollo, y por compartir tantas tardes en el laboratorio, en especial las de verano.

A todos los demás compañeros, técnicos, predocs y postdoc, que en algún momento me han echado una mano compartiendo su tiempo y sus conocimientos conmigo. Gracias por vuestro apoyo y ayuda.

A mi familia, en especial a Jose, mi hermano, Mari Carmen y mis pequeñas sobrinas Carmen y Ana por aportar vuestra alegría y sacarme una sonrisa con vuestra inocencia y vuestro cariño.

A mis segundos padres, Gerardo y Celia, a mis otros hermanos, Gerar y Sergio, Sarah y Elisa, y a mi amiga Lore, porque aunque no supierais de que os hablaba cuando me preguntabais por el trabajo, siempre creísteis en mi y en lo que hacía.

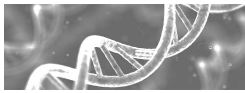
A mis padres porque gracias a su esfuerzo y trabajo me dieron la oportunidad que ellos no tuvieron. Porque la vida no fue fácil para ellos y aún así su compromiso y esfuerzo por mi formación me permite hoy estar defendiendo el grado máximo al que se puede optar en nuestro sistema educativo. Gracias por vuestro esfuerzo, amor y dedicación, durante toda mi vida, sin vosotros hubiera sido imposible haber llegado hasta aquí, por eso aunque sea yo el que presente esta memoria de tesis doctoral también es un triunfo vuestro.

A Carolina, mi mujer, la mejor compañera y amiga, por confiar siempre en mi y no dejarme nunca mirar atrás ni desfallecer en el esfuerzo que ha costado la realización de esta tesis. Gracias por estar siempre a mi lado escuchándome, comprendiéndome y apoyándome en todo, dentro y fuera del trabajo. Porque esta tesis es casi tan tuya como mía, sin tu ayuda esto no sería posible. Gracias por ser la mejor.

A todas esas personas que de manera especial me han ayudado con su amistad y cariño y han contribuido con pequeñas y grandes cosas a alegrarme la vida durante estos años haciendo que todo pareciera más fácil.

ÍNDICE

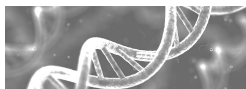
Índice de abreviaturas	13
Índice de figuras	17
Índice de tablas	18
Resumen	19
I. Introducción	27
1.1 Historia de la artrosis	29
1.2 Definición y clasificación de la artrosis	32
1.2.1 Definición de artrosis	32
1.2.2 Etiopatogenia de la artrosis	33
1.2.3 Clasificación de la artrosis	38
1.2.4 Técnicas de imagen en la clasificación de la artrosis.	42
1.3 Prevalencia de la artrosis	51
1.4 Impacto socio-económico de la artrosis	54
1.5 Factores de riesgo	55
1.5.1 Factores no modificables	56
1.5.2 Factores modificables	67
1.6 La mitocondria	68
1.6.1 Generalidades	68
1.6.2 Genoma mitocondrial	74
1.6.3 Enfermedades mitocondriales	77
1.7 Mitocondria y artrosis	83
1.8 Haplogrupos mitocondriales	86
1.8.1 Origen de los haplogrupos mitocondriales	86
1.8.2 Haplogrupos y patologías	88
1.8.3 Haplogrupos y artrosis	92
1.9 Interacción núcleo-mitocondria	97
1.10 <i>Osteoarthritis Initiative (OAI)</i>	100
II. Objetivos	105
III. Capítulos	109
3.1 Capítulo 1. <i>“mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations”</i>	111
3.2 Capítulo 2. <i>“Mitochondrial DNA haplogroups modulate the radiographic progression of Spanish patients with osteoarthritis”</i>	123
3.3 Capítulo 3. <i>“Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups influence the progression of knee osteoarthritis. Data from the Osteoarthritis Initiative (OAI)”</i>	137
3.4 Capítulo 4. <i>“Mitochondrial haplogroups define two phenotypes of osteoarthritis”</i>	155
IV. Discusión	169
4.1 Discusión capítulo 1	171
4.2 Discusión capítulo 2	175
4.3 Discusión capítulo 3	181



4.4 Discusión capítulo 4	187
4.5 Discusión general.	191
V. Conclusiones	197
VI. Bibliografía	201
VII. Anexos	225
7.1 Anexo 1: Material suplementario del capítulo 1	227
7.2 Anexo 2: Material suplementario del capítulo 3	231
7.3 Anexo 3: Artículos complementarios	237

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACAN	<i>Aggrecan</i> (gen)
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADAMTS4	<i>ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 4</i> (gen)
ADNmt	ADN mitocondrial
ADP	Adenosín difosfato
ALDH1A2	<i>aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2</i> (gen)
ARNmt	ARN mitocondrial
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ASPN	<i>Asporin</i> (gen)
ASTN2	<i>Astrotactin 2</i> (gen)
ATP	Adenosín trifosfato
AUC	<i>Area Under Curve</i>
BLOKS	<i>Boston Leeds Osteoarthritis Knee Score</i>
BTNL2	<i>Butyrophilin-like 2</i> (gen)
CALM1	<i>Calmodulin 1</i> (gen)
CHST11	<i>Carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11</i> (gen)
COG5	<i>Component of oligomeric golgi complex 5</i> (gen)
COL2A1	<i>Collagen, type II, alpha 1</i> (gen)
COMP	Proteína oligomérica de matriz de cartílago
CTE	Cadena de transporte electrónico
D-loop	Región control
DIO2	<i>Deiodinase, iodothyronine, type II</i> (gen)
DIO3	<i>Deiodinase, iodothyronine, type III</i> (gen)
DKK1	<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i> (gen)
DOTL1	<i>DOT1-Like Histone H3K79 Methyltransferase</i> (gen)
DUS4L	<i>Dihydrouridine synthase 4-like</i> (gen)
DVWA	<i>Collagen, type VI, alpha 4 pseudogene 1</i> (gen)
EIM	Espacio intermembrana
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EPISER	Prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido
FILIP1	<i>Filamin A interacting protein 1</i> (gen)
FRZB	<i>Frizzled-related protein</i> (gen)
GDF5	<i>Growth differentiation factor 5</i> (gen)
GLT8D1	<i>Glycosyltransferase 8 domain containing 1</i> (gen)
GNL3	<i>Guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)</i> (gen)
GPR22	<i>G protein-coupled receptor 22</i> (gen)
GWAS	<i>Genome wide association studies</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HA	Ácido hialurónico
HBP1	<i>HMG-box transcription factor 1</i> (gen)



HMG	<i>High Mobility Group</i>
HmtDB	<i>Human Mitochondrial Database</i>
HOAMS	<i>Hip Osteoarthritis Magnetic Resonance Imaging Scoring System</i>
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
JSN	Reducción del espacio articular
JSW	Anchura de espacio articular
KL	<i>Kellgren-Lawrence</i>
KLHDC5	<i>Kelch domain containing 5 (gen)</i>
KOOS	<i>Knee Osteoarthritis Scoring System</i>
LHON	Retinopatía óptica de Leber
LR	<i>Likelihood Ratio</i>
MCF2L	<i>MCF.2 cell line derived transforming sequence-like (gen)</i>
MELAS	Acidosis láctica y episodios de accidente cerebrovascular
MERRF	Síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas
MILS	Síndrome de Leigh de herencia materna
MITOMAP	<i>Human mitochondrial genome database</i>
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MMP	Metaloproteasas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NARP	Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa
NCOA3	<i>Nuclear receptor coactivator 3 (gen)</i>
NO	Del inglés <i>nitric oxide</i> , óxido nítrico
OA	Artrosis
OAI	<i>Osteoarthritis Initiative</i>
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
p38 MAPK	<i>P38 mitogen-activated protein kinases</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandinas E2
PIB	Producto interior bruto
PINP	Procolágeno tipo I N-propéptido
PTH1H	<i>Parathyroid hormone-like hormone (gen)</i>
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SBE	Del inglés <i>Single Base Extension</i> , extensión en base simple
SENp6	<i>SUMO1/sentrin specific peptidase 6 (gen)</i>
SER	Sociedad Española de Reumatología
SF-12	<i>Medical Outcomes Study Short Form 12</i>
SMAD3	<i>SMAD family member 3 (gen)</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

SOD1	Cobre/zinc superóxido dismutasa
SOD2	Manganeso superóxido dismutasa
SOX11	<i>SRX (sex determining region Y)-box 11</i> (gen)
SREBP2	<i>Sterol regulatory element binding transcription factor 2</i> (gen)
SURF1	<i>Surfeit locus protein 1</i>
TC	Tomografía computerizada
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
TOR	<i>Target Of Rapamycin</i>
uCTX-II	Telopéptidos urinarios C-terminal de colágeno II
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WOMAC	<i>Western Ontario and McMasters Osteoarthritis Index</i>
WORMS	<i>Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Lección de anatomía del Doctor Tulp (Rembrandt).

Figura 2: Representación de las principales estructuras articulares que conforman la rodilla y los procesos degenerativos más importantes que tienen lugar durante la artrosis.

Figura 3: Hueso subcondral en la artrosis.

Figura 4: Representación de los cambios morfológicos articulares asociados al grado de afectación articular.

Figura 5: Representación de los cambios fisiológicos y morfológicos que sufre el cartílago articular según la graduación de la escala OARSI.

Figura 6: Utilidad de los tiempo T1 y T2.

Figura 7: Incidencia de la artrosis de manos, cadera y rodilla por sexo y edad.

Figura 8: Principales factores de riesgo asociados a la artrosis.

Figura 9: Representación gráfica de la influencia de la edad sobre el cartílago articular.

Figura 10: Representación de la distribución del número de pacientes por tipo de artrosis y sexo al que pertenecen.

Figura 11: Estructura básica y componentes de una mitocondria.

Figura 12: Producción de ATP mitocondrial.

Figura 13: Representación de la cadena de transporte electrónico.

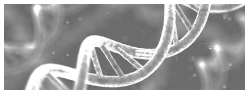
Figura 14: ADN mitocondrial.

Figura 15: Enfermedades causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial.

Figura 16: Mapa de la distribución de los haplogrupos mitocondriales.

Figura 17: Participación del núcleo en los procesos mitocondriales.

Figura 18: Miembros fundadores de la OAI.



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Prevalencia de la artrosis según las diferentes localizaciones en las que se puede presentar.

Tabla 2: Escala radiológica Kellgren-Lawrence para la clasificación de pacientes artrósicos.

Tabla 3: Escala radiológica OARSI para la clasificación de la artrosis de rodilla.

Tabla 4: Criterios Radiológicos y clínicos del *American College of Rheumatology (ACR)* para el diagnóstico de la artrosis de rodilla, cadera y manos.

Tabla 5: Prevalencia de las artrosis de cadera y rodilla en diferentes poblaciones mundiales.

Tabla 6: Genes asociados con diferentes tipos de artrosis

Tabla 7: Genes asociados con diferentes tipos de artrosis en estudios de asociación de genoma completo.

Tabla 8: Enfermedades para las que se ha encontrado asociación con mutaciones en el genoma mitocondrial.

Tabla 9: Relación de los haplogrupos con la predisposición o protección frente a diferentes patologías.

RESUMEN

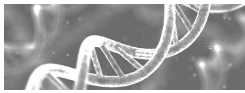
RESUMEN

La artrosis es la enfermedad reumatológica más común y se caracteriza por una degeneración del cartílago articular junto con el resto de estructuras que forman parte de la articulación. Su prevalencia es elevada y se espera que se incremente notablemente en las próximas décadas debido al envejecimiento de la población. Es la principal causa de incapacidad laboral y una de las principales razones de consulta en medicina general. La artrosis conlleva unos elevados costes económicos tanto desde el punto de vista laboral, como médicos y de calidad de vida. Es una enfermedad compleja y multifactorial en la que interactúan tanto factores ambientales como genéticos.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la implicación de la mitocondria en la artrosis a través de diferentes estudios. A pesar de que el metabolismo energético del condrocito es fundamentalmente glucolítico, la mitocondria tiene un papel relevante en la artrosis no solo por la aportación energética que hace a través del proceso de fosforilación oxidativa en la producción de ATP, sino que además la mitocondria constituye la principal fuente de generación de especies reactivas de oxígeno, además de regular los mecanismos de apoptosis en el condrocito, único tipo celular presente en el cartílago, entre otras funciones celulares. La mitocondria posee su propio material genético que, debido a la adaptación a las condiciones climáticas y ambientales sufridas a lo largo de las diferentes migraciones de la especie humana desde su origen africano, ha adquirido una serie de mutaciones estables que permiten caracterizar a las poblaciones humanas según su origen geográfico. Los diferentes conjuntos de polimorfismos característicos de cada una de estas poblaciones han dado lugar a los haplogrupos mitocondriales. Debido a su origen adaptativo a las condiciones ambientales, cada haplogrupo presenta unos mecanismos y funciones metabólicas diferentes. Estas diferencias se han relacionado con la predisposición a padecer diferentes enfermedades, entre las que se encuentra la artrosis.

El objetivo de esta tesis es replicar los resultados obtenidos por Rego-Pérez et al. sobre la influencia de los haplogrupos mitocondriales en la prevalencia de la artrosis en diferentes cohortes mundiales, así como evaluar la participación de los haplogrupos en la progresión de la enfermedad.

El primer trabajo de esta tesis analiza la implicación de los haplogrupos en la artrosis comparando los porcentajes de prevalencia en una cohorte del norte de España con los de una cohorte del Reino Unido. Los resultados obtenidos mostraron que existía una asociación diferencial entre las frecuencias de los haplogrupos de ambas cohortes con la artrosis. De manera que, en la cohorte española es el haplogrupo J el que actúa como factor protector frente a la artrosis, mientras que en la cohorte británica es el



haplogrupo T el que muestra una asociación estadísticamente significativa como factor protector de artrosis.

En el segundo trabajo de esta tesis se analizó la relación de los haplogrupos con la progresión en artrosis. Para ello se utilizaron los datos radiográficos de una cohorte de pacientes del hospital Universitario de A Coruña considerando progresión radiográfica como el incremento en el grado KL durante un periodo de seguimiento de al menos 36 meses. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la influencia de los haplogrupos sobre la progresión en artrosis, siendo los pacientes pertenecientes al clúster TJ los que presentaban una progresión más lenta de la patología mientras que los portadores del haplogrupo H mostraron una mayor predisposición a alcanzar la prótesis articular..

El tercer trabajo consistió en replicar los resultados obtenidos en el segundo trabajo en una amplia y bien caracterizada cohorte Norteamericana de pacientes artrósicos de rodilla pertenecientes a la *Osteoarthritis Initiative*. En este estudio se analizó la influencia de los haplogrupos en la progresión de la enfermedad a través de las magnitudes (grado KL, presencia de osteofitos, esclerosis subcondral y la reducción de espacio articular) obtenidas de las imágenes radiográficas de las rodillas de los pacientes incluidos en el estudio. Asimismo, también se estudió la degradación estructural de la articulación mediante las medidas del grosor y el volumen de cartílago en las diferentes zonas que componen la rodilla, obtenidas a partir de imágenes de resonancia magnética. Los resultados mostraron que el haplogrupo T era el que presentaba una progresión radiográfica más lenta que el resto de haplogrupos así como una menor pérdida de grosor y volumen de cartílago en el tiempo en diferentes zonas del compartimento medial de la rodilla.

Para finalizar se realizó también un estudio sobre la capacidad de los haplogrupos para distinguir entre diferentes fenotipos de pacientes artrósicos analizando los niveles en suero de algunos de los principales marcadores moleculares de artrosis. Los resultados obtenidos permitieron distinguir claramente dos fenotipos de artrosis; de este modo, los pacientes con mayores niveles séricos de marcadores catabólicos fueron los pacientes portadores del haplogrupo H frente a los pacientes portadores del haplogrupo J. Los resultados de este trabajo mostraron que los haplogrupos mitocondriales son posibles biomarcadores complementarios de artrosis con aplicación en la práctica clínica.

En resumen, los resultados de los 4 trabajos que forman parte de esta tesis ponen de manifiesto la influencia de los haplogrupos mitocondriales en la patología artrósica. Las diferentes asociaciones encontradas entre las distintas cohortes analizadas podrían reflejar la adaptación de los haplogrupos a los diferentes patrones climáticos.

RESUMO

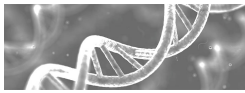
A artrose é a enfermidade reumatolóxica máis común e caracterízase por unha dexeneración da cartilaxe articular xunto co resto de estruturas que forman parte da articulación. A súa prevalencia é elevada e esperase que se incremente notablemente nas próximas décadas debido o envellecemento da poboación. É a principal causa de incapacidade laboral e unha das principais razóns de consulta na medicina xeral. A artrose leva consigo uns elevados custos económicos tanto dende o punto de vista laboral como médico e de calidade de vida. É unha enfermidade complexa e multifactorial na que interactúan tanto factores ambientais como xenéticos.

Nos últimos anos púxose de manifesto a implicación da mitocondria na artrose a través de diferentes estudos. A pesar de que o metabolismo enerxético do condrocito é fundamentalmente glucolítico, a mitocondria ten un papel relevante na artrose non só pola achega enerxética que fai a través do proceso de fosforilación oxidativa na produción de ATP, senón que ademais a mitocondria constitúe a principal fonte de xeración de especies reactivas de osíxeno, ademais de regular os mecanismos de apoptose no condrocito, único tipo celular presente na cartilaxe, entre outras funcións celulares. A mitocondria posúe ademais o seu propio material xenético que, debido á adaptación ás condicións climáticas e ambientais sufridas ao longo das diferentes migracións da especie humana dende a súa orixe africana, adquiriu unha serie de mutacións estables que permitiron caracterizar as poboacións humanas segundo a súa orixe xeográfica. Os diferentes conxuntos de polimorfismos característicos de cada unha destas poboacións deron lugar aos haplogrupos mitocondriais. Debido á súa orixe adaptativa ás condicións ambientais, cada haplogrupo presenta uns mecanismos e funcións metabólicas diferentes. Estas diferenzas relacionáronse coa predisposición a padecer diferentes enfermidades, entre as que se encontra a artrose.

O obxectivo desta tese é replicar os resultados obtidos por Rego-Pérez et al. sobre a influencia dos haplogrupos mitocondriais na prevalencia da artrose en diferentes cohortes mundiais, así como avaliar a participación dos haplogrupos na progresión da enfermidade.

O primeiro traballo desta tese analiza a implicación dos haplogrupos na artrose comparando as porcentaxes de prevalencia nunha cohorte do norte de España cos dunha cohorte do Reino Unido. Os resultados obtidos mostraron que existía unha asociación diferencial entre as frecuencias dos haplogrupos de ambas as dúas cohortes coa artrose. De maneira que, na cohorte española é o haplogrupo J o que actúa como factor protector fronte á artrose, mentres que na cohorte británica é o haplogrupo T o que mostra unha asociación estatisticamente significativa como factor protector de artrose.

No segundo traballo desta tese analizouse a relación dos haplogrupos coa progresión en artrose. Para iso utilizáronse os datos clínicos e radiográficos dunha cohorte de pacientes do hospital Universitario da Coruña avaliando a progresión radiográfica a través do incremento no grao KL durante un período de seguimento de polo menos 36 meses. Os resultados obtidos puxeron de manifesto a influencia dos haplogrupos sobre a progresión en artrose, sendo os pacientes pertencentes ao clúster TJ os que presentaban



unha progresión máis lenta da patoloxía, mentres que os portadores do haplogrupo H amosaron unha maior predisposición a alcanzar a prótese articular.

O terceiro traballo desta tese consistiu en replicar os resultados obtidos no segundo traballo nunha ampla e ben caracterizada cohorte norteamericana de pacientes artrósicos de xeonllo pertencentes á Osteoarthritis Initiative. Neste estudo analizouse a influencia dos haplogrupos na progresión da enfermidade a través das magnitudes (grao KL, presenza de osteofitos, esclerose subcondral e a redución de espazo articular) obtidas das imaxes radiográficas dos xeonllos dos pacientes incluídos no estudo. Asimesmo tamén se estudou a degradación estrutural da articulación mediante as medidas do grosor e o volume de cartilaxe nas diferentes zonas que compoñen o xeonllo, obtidas a partires de imaxes de resonancia magnética. Os resultados mostraron que o haplogrupo T era o que presentaba unha progresión radiográfica máis lenta que o resto de haplogrupos así como unha menor perda de grosor e volume de cartilaxe no tempo en diferentes zonas do compartimento medial do xeonllo.

Para finalizar realizouse tamén un estudo sobre a capacidade dos haplogrupos para distinguir entre diferentes fenotipos de pacientes artrósicos analizando os niveis en soro dalgúns dos principais marcadores moleculares de artrose. Os resultados obtidos permitiron distinguir claramente dous fenotipos de artrose, deste modo, os pacientes con maiores niveis séricos de marcadores catabólicos foron os pacientes portadores do haplogrupo H fronte aos pacientes portadores do haplogrupo J. Os resultados deste traballo mostraron que os haplogrupos mitocondriais son posibles biomarcadores complementarios de artrose con aplicación na práctica clínica.

En resumo, os resultados dos 4 traballos que forman parte desta tese poñen de manifesto a influencia dos haplogrupos mitocondriais na patoloxía artrósica. As diferentes asociacións atopadas entre as distintas poboacións analizadas poderían estar a reflexar a adaptación dos haplogrupos aos diferentes patróns climáticos.

ABSTRACT

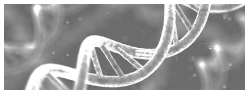
Osteoarthritis (OA) is the most common rheumatic disease related to ageing and is characterized by the degeneration of articular cartilage together with the rest of joint structures. Since OA is an age-related disease, its prevalence and burden are expected to increase substantially in the near future due to demographic changes and ageing population. OA is the leading cause of work incapacitation and one of the most common reasons for visiting primary care physicians. The economic cost of OA is also particularly high, resulting in a decreased quality of life, hospitalizations and loss of productivity. OA is a multifactorial disease in which both environmental and genetic factors interact.

In recent years a growing body of evidence suggests the implication of the mitochondria in the pathogenesis of OA, even though the glycolytic nature of articular chondrocytes. In addition to the energetic contribution, mitochondria is the main source of reactive oxygen species which lead to cause significant oxidative damage to the cell, and one of the major cellular pathways of apoptosis in OA chondrocytes, among other cellular functions. Mitochondria also have their own DNA and, as the result of an adaptive process to the new climatic and environmental conditions suffered throughout the different migrations humans from their African origin, it acquired a series of stable mutations that allow nowadays the characterization of human populations according to their geographical origin. So, a particular set of single nucleotide polymorphisms defines each of the mtDNA haplogroups, and these haplogroups represent populations of different ancestral origins. As a result of their environmental adaptation, each haplogroup shows different mechanisms and metabolic functions. Recent studies provided evidence that mtDNA haplogroups influence the penetrance and clinical severity of modern diseases, including OA.

The aim of this thesis is to reply the results obtained by Rego-Pérez et al. on the influence of the mitochondrial haplogroups in the prevalence of OA in different world cohorts, as well as to evaluate the participation of the haplogroups in the progression of the disease.

In the first chapter of this thesis we analyze the frequency distribution of the mtDNA haplogroups in two OA cohorts of populations from different geographic locations. The results obtained showed a differential association among the frequencies of the haplogroups of both cohorts with OA. The haplogroup J appeared underrepresented in OA patients from Spain when compared with the healthy controls whereas the haplogroup T showed a decreased risk of OA in the UK cohort.

In the second work of this thesis we analyzed the influence of the mtDNA haplogroups on the radiographic progression of OA. We evaluated the radiographic progression in a well-characterized follow-up cohort of Spanish patients, from Hospital Universitario de A Coruña, defining OA progression as any radiographic worsening of the KL score in a follow up period of not less than 36 months between radiographs. The results showed that patients belonging to cluster TJ had a slower OA progression and patients with mtDNA



haplogroup H were more apt to require joint replacement surgery than non-H carriers.

In the third work we evaluated the occurrence of the mtDNA haplogroups in the progression of knee OA using the longitudinal data obtained from radiographs and magnetic resonance images of knee OA patients belonging to the progression subcohort of the Osteoarthritis Initiative. In this study the progression criteria was defined as an increase of at least one KL grade in either knee; additionally, we also analyzed the progression of joint space narrowing, osteophytes and subchondral sclerosis in the medial compartment where the progression criteria was an increase of at least one OARSI atlas grade in either knee. We also analyzed the cartilage integrity by measuring cartilage thickness and volume through magnetic resonance images from knee OA patients. The results revealed that patients carrying mtDNA haplogroup T show a lower cumulative probability of radiographic progression as well as a significant reduced loss of knee cartilage thickness and volume over time in the medial compartment of the knee.

Finally, the fourth study aims to assess a mitochondrion-related phenotype in OA patients. We analyzed the serum levels of OA-related biomarkers between OA patients and healthy controls in carriers of haplogroups H and J. The results showed two different mitochondrion-related OA phenotypes clearly defined, thereby, patients that carry haplogroup H showed higher levels of catabolic markers of OA than OA patients carrying the mtDNA haplogroup J.

Briefly, the results of the 4 works that form part of this thesis show the influence of the mitochondrial haplogroups in the OA disease. The different association found among cohorts could reflect the adaptation of the mtDNA haplogroups to different climatic patterns.

I.INTRODUCCIÓN

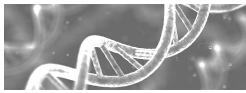
1.1 HISTORIA DE LA ARTROSIS

Históricamente se puede considerar a la artrosis como una enfermedad reciente, ya que al estar asociada a la edad y no tratarse de una enfermedad mortal, no ha tenido una relevancia importante en la sociedad hasta las últimas décadas. A esto hay que añadir que, hasta hace poco, la artrosis ha sido una patología de difícil diagnóstico diferencial, debido fundamentalmente a las variadas manifestaciones clínicas y sintomatológicas de la misma, muchas veces confundidas y asociadas a las de otras enfermedades reumáticas. Fruto de este desconocimiento, hasta finales del siglo XVIII todas las enfermedades reumáticas se englobaban dentro de la patología de la gota ^{1,2}.

La existencia de la artrosis está documentada desde la antigüedad. Si bien estas referencias históricas son pocas y difusas, ya que tanto la corta edad de vida de la población como el enorme impacto causado por las diferentes pandemias que han asolado a la humanidad en la antigüedad causando numerosas muertes, han provocado que la artrosis existiera de una manera silente y se asociara en muchos casos su sintomatología a la de otras enfermedades.

Existe constancia científica de la artrosis ya desde la época de los dinosaurios tal como recoge *Moodie* en su trabajo sobre un fósil de 100 millones de años ³. Los primeros testimonios de la presencia de la artrosis en humanos datan del antiguo Egipto ^{4,5}, aunque existe cierta controversia sobre si los defectos articulares observados en los restos humanos antiguos son debidos a la artrosis o a un efecto de la degeneración causada por el tiempo, como puede ser la descalcificación del tejido óseo. Si nos remontamos a los ancestros de los seres humanos actuales, como el hombre de Cro-Magnon y el hombre de Neanderthal, los trabajos de Ackerknecht y Straus encuentran signos de que estos homínidos ya sufrían artrosis ^{6,7}.

Para encontrar los primeros testimonios escritos y pictóricos de la artrosis debemos retroceder hasta el Renacimiento (s.XIV-XVI). Esta época, caracterizada por una liberación en la mentalidad del ser humano, permitió la evolución de la medicina hacia el campo científico ya que hasta ese momento



estaba muy ligada al mundo espiritual y a las creencias de poderes curativos mágicos. Así, junto a otras áreas científicas, la anatomía (Figura 1) sufrió una importante evolución. Fruto de esta revolución intelectual, en 1543 Andreas Vesalius publicó "*De humani corporis fabrica*", un tratado de anatomía muy completo basado en las observaciones de muchas disecciones de cadáveres humanos. Entre los temas tratados se pueden encontrar descripciones de las articulaciones muy detallistas que definen casi a la perfección las funciones del cartílago ⁸; sirva como ejemplo el siguiente fragmento:

"Otra función de los cartílagos, y una de las más importantes, es permitir a los huesos mantenerse en la continuidad y moverse continuamente, desgastándose menos por la fricción. Los puntos de encuentro de los huesos contruidos para el movimiento se verían fácilmente dañados (debido a la sequedad del hueso) por el simple contacto si las superficies que están en contacto y que forman una articulación no estuviesen recubiertas completamente y por separado, de un cartílago suficientemente duro y flexible para resistir a los impactos de los huesos y que, al ceder ligeramente, atenúa la fuerza de su contacto. Los cartílagos no sólo sirven para disminuir la fricción de los huesos en los puntos en los que pueden desgastarse por contacto, sino que parecen tan lisos y regulares que el extremo de un hueso gira fácilmente en su cavidad; no hay ninguna rugosidad que impida esta facilidad de movimiento si está presente un líquido viscoso y deslizante, que podemos comparar al lubricante utilizado para las poleas por las que se deslizan las cuerdas."



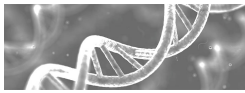
Figura 1: Lección de anatomía del Doctor Tulp (Rembrandt).

Hacia el año 1740 se producen las primeras descripciones del cartílago artrósico por parte de Morgagni y Hunter ⁸. Pero no sería hasta el año 1782 cuando William Heberden diferenciaría por primera vez un trastorno reumático de la enfermedad de la gota describiendo los nódulos que llevan su nombre en la actualidad ⁹.

En 1890 Archivald Garrod acuñó por primera vez el término “*artrosis*” para definir la patología articular. Antes, en el año 1835, Robert Smith había descrito la artrosis de cadera. El gran avance en el conocimiento y estudio de la patología artrósica se produce con la aparición y perfeccionamiento de las técnicas de rayos X ¹. Así, basándose en los datos radiográficos extraídos de las imágenes obtenidas mediante esta tecnología, Kellgren y Lawrence, establecieron la escala de graduación que lleva su nombre y que clasifica a los pacientes según el grado de afectación de la articulación. Actualmente es una de las principales escalas de referencia en el ámbito clínico ^{10,11}.

El aumento gradual de la esperanza de vida desde la época de la revolución industrial acompañado de la evolución en el campo de la medicina y el desarrollo de las técnicas de radiodiagnóstico permitió, por un lado, observar un aumento en la incidencia de la patología y, por otro, la capacidad de diagnosticar de manera más eficiente la artrosis y estudiar sus diferentes variantes discriminando esta patología de otras enfermedades ¹².

Actualmente, el desarrollo de las nuevas metodologías de imagen aplicadas al diagnóstico y seguimiento de la artrosis, como la resonancia magnética o los ultrasonidos, permiten obtener gran cantidad de información sobre la morfología y grado de afectación de las estructuras y tejidos articulares afectados por la artrosis. Esta información, combinada con los estudios moleculares, ha permitido la identificación de una serie de marcadores moleculares y morfológicos de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, también conocidos como biomarcadores. Si bien, los resultados siguen siendo en muchos casos poco reproducibles y en la actualidad aún no existe ningún biomarcador incorporado a la práctica clínica ¹³.



1.2 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA ARTROSIS

1.2.1 Definición de artrosis

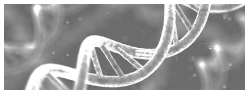
La definición clásica de la artrosis es la de una enfermedad articular degenerativa que se caracteriza por una degradación de la estructura del cartílago llegando, en etapas avanzadas, a afectar al hueso subcondral ¹⁴. Esta definición clásica ha evolucionado en los últimos tiempos hacia una definición más amplia, en el sentido de que pasa a considerarse la artrosis como una afectación global de todas las estructuras de la articulación, es decir, no sólo el cartílago se ve afectado sino también la membrana sinovial, el hueso subcondral, los ligamentos y los meniscos, en el caso de la artrosis de rodilla por ejemplo ¹⁵⁻¹⁷. Se considera por tanto la artrosis como un proceso degenerativo a nivel global de la articulación ¹⁸. Cabe destacar que la *European League Against Rheumatism (EULAR)* ha publicado recientemente una guía de recomendaciones sobre los puntos a potenciar en futuras investigaciones sobre la artrosis ¹⁹ y entre estas recomendaciones se encuentra el prestar especial atención al papel que juegan en el proceso artrósico las estructuras no cartilaginosas de las articulaciones y las interacciones que se establecen entre todas las estructuras que forman parte de la articulación ²⁰. A la vista de todo lo anterior podemos dar una definición actualizada de la artrosis, de manera que la ésta se define como una enfermedad articular degenerativa que se caracteriza por una degradación del cartílago articular, un engrosamiento del hueso subcondral, la formación de osteofitos, la inflamación de la membrana sinovial, la degeneración de los ligamentos y, en el caso de la rodilla, también los meniscos, además de una hipertrofia de la capsula articular. Estos cambios patológicos en los tejidos que conforman la articulación constituyen el ímpetu por considerar a la artrosis como una enfermedad de la articulación como un órgano en sí misma en la que se acaba desencadenando una disfunción orgánica ²¹.

1.2.2 Etiopatogenia de la artrosis

Como ya se ha mencionado anteriormente, la artrosis es un proceso degenerativo, asociado a la edad, de las estructuras que conforman la articulación. Durante este proceso se produce la destrucción del cartílago hialino que recubre la superficie de la articulación y que está compuesto por agua, colágeno y proteoglicanos mientras que los condrocitos, que representan entorno al 2% del volumen total del cartílago, son el único componente celular. Esta desestructuración y destrucción se produce por un desequilibrio entre los procesos anabólicos y catábolicos, que regulan el correcto funcionamiento de los tejidos y estructuras de la articulación, y surge como consecuencia de los cambios biomecánicos y bioquímicos que tienen lugar en la misma. En consecuencia se produce la segregación de una serie de sustancias con características proinflamatorias como son las interleucinas, el factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *Tumor Necrosis Factor*) y las prostaglandinas (PG), entre otras, que sobrepasan la capacidad reparadora de los mecanismos de mantenimiento y reparación del cartílago ²².

En el cartílago artrósico se han encontrado elevados niveles de metaloproteasas (MMP) entre las que destacan: MMP-1, MMP-8 y MMP-13. Las MMP provocan la fibrilación del cartílago articular incrementando la hipertrofia y la hidratación del mismo así como el debilitamiento de la red de las fibras de colágeno. La MMP-13 actúa en las capas intermedia y profunda del cartílago siendo responsable del proceso de remodelación del mismo en estas zonas. La MMP-1 se asocia con la presencia del proceso inflamatorio mientras que la MMP-8 se relaciona con la progresión de la artrosis. Las MMP-2 y 9 se hayan también sobre-expresadas en el cartílago artrósico no detectándose esta última en el cartílago sano. Aunque la principal metaloproteasa de degradación de proteoglicanos es la MMP-3, que aparece incrementada en la artrosis incidente, mientras que sus niveles disminuyen en fases avanzadas ²³.

Otros factores que contribuyen a la degradación del cartílago son las citocinas pro-inflamatorias IL-1B (IL: interleucina) y el TNF. La IL-1B provoca una disminución en la síntesis de macromoléculas de la matriz extracelular del cartílago, estimula la producción de los colágenos tipo I y III provocando a su



vez una disminución en la síntesis de colágeno tipo II, lo que conlleva a una inapropiada reparación de la matriz extracelular del cartílago²². Existen otras citocinas pro-inflamatorias que intervienen en el proceso artrósico, como son la IL-6, IL-8, IL-17 e IL-18, de las cuales aún no se conoce el papel exacto que desempeñan en el proceso artrósico. La prostaglandina E2 (PGE2) interviene en el proceso inflamatorio y puede a su vez potenciar los efectos de otros mediadores pro-inflamatorios promoviendo además la producción de MMPs ²². Como mecanismo compensatorio de estos factores catabólicos, los condrocitos generan factores anabólicos, principalmente factores de crecimiento. Sus niveles se encuentran más elevados en pacientes artrósicos, sin embargo no son suficientes para evitar la degradación del cartílago y la progresión de la patología.

Los condrocitos son los encargados de la síntesis y el mantenimiento de la matriz extracelular. Las propiedades de absorción de los impactos mecánicos que posee el cartílago hialino se atribuyen a su composición y estructura, que está formada por proteoglicanos (agrecanos) incluidos en una densa red de fibras de colágeno y que contiene una elevada proporción de agua. Los agreanos representan probablemente el primer componente del cartílago que se ve afectado en el inicio del proceso artrósico ²². De este modo en paralelo al avance de la enfermedad, la síntesis y fijación de agreanos va perdiendo efectividad y las nuevas moléculas generadas de los mismos no se llegan a fijar de forma efectiva siendo liberadas al líquido sinovial, produciéndose una degradación progresiva de la matriz extracelular del cartílago. En el caso del otro componente mayoritario del cartílago, el colágeno, es la acción de las colagenasas la que va a provocar su degradación. Durante el desarrollo de la patología la degradación del tejido articular aparece como consecuencia de los diferentes procesos biológicos que actúan sobre todos los componentes y tejidos articulares y no sólo sobre el cartílago ²⁴ (Figura 2).

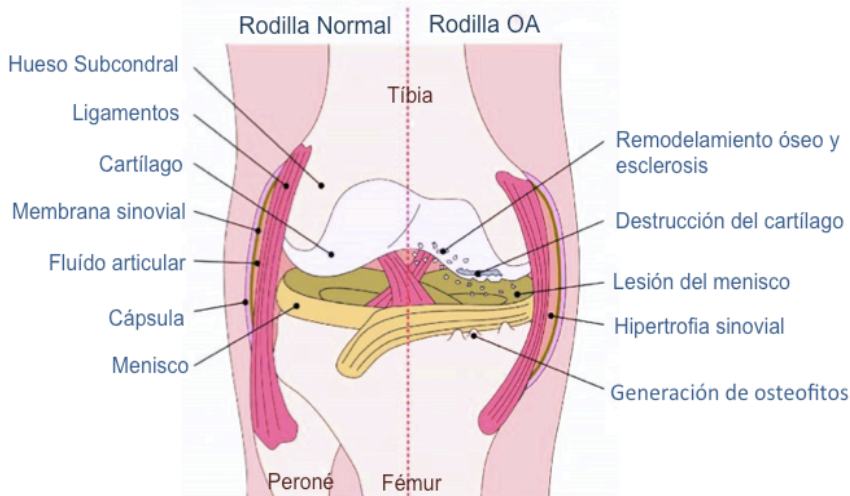
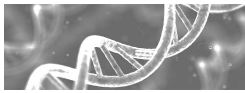


Figura 2: Representación de las principales estructuras articulares que conforman la rodilla y los procesos degenerativos más importantes que tienen lugar durante la artrosis.

Otra de las estructuras implicadas en el proceso artrósico es el hueso subcondral. Existe un creciente número de evidencias sobre el papel que desempeña el hueso subcondral en la artrosis ²⁵. Una vez que se ha iniciado el proceso artrósico y el cartílago no cumple su función básica, se produce una sobrecarga sobre el resto de las estructuras articulares: meniscos, ligamentos y hueso subcondral; este último normalmente absorbe entre un 30-50% de los esfuerzos generados por las cargas sobre la articulación, generándose en consecuencia alteraciones en dichas estructuras que forman parte del proceso artrósico y que se encuentran en contacto directo con el cartílago ^{26,27}. Recientemente se han descrito diferentes evidencias, tanto en humanos como en modelos animales, que muestran que las alteraciones en la estructura del hueso subcondral podrían preceder, y ser por tanto una causa de la degradación de la estructura del cartílago. El hueso subcondral juega un papel activo en el inicio y la progresión de la artrosis generando factores catabólicos y alterando el metabolismo del cartílago. En esta línea, existen estudios en los que se observa la coincidencia en la liberación en el suero de diferentes factores moleculares, tanto por el cartílago como por el hueso subcondral, en el inicio del proceso artrósico, lo que implica que ambos procesos son funcionalmente interdependientes y funcionan como una unidad y no como



tejidos separados ^{28,29} (Figura 3) ³⁰. Otros estudios refuerzan la relación entre las lesiones en la médula ósea y los quistes óseos en la patogénesis de la artrosis de rodilla ^{31,32}. En este sentido, se ha descrito que, en pacientes con artrosis de rodilla de grado medio, la presencia de lesiones en la médula ósea se asocia con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad ³³. Además las lesiones provocadas en la médula ósea por traumatismos en la rodilla se asocian con el dolor que sufren los pacientes artrósicos ³⁴. Otro aspecto a destacar es la esclerosis del hueso subcondral, que surge de un incremento en la rigidez y en la densidad, aunque no en la densidad mineral ósea y que algunos estudios apuntan a su aparición en estadios avanzados de la enfermedad ³⁵.

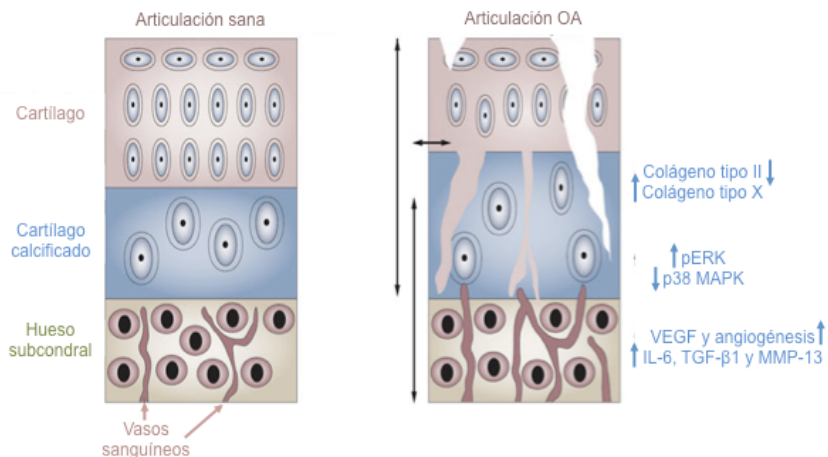


Figura 3: Hueso subcondral en la artrosis. La figura representa la influencia del hueso subcondral sobre el proceso artrósico y su interrelación con el cartilago articular. En la articulación sana el cartilago calcificado actúa como zona de regulación en el intercambio de fluidos y solutos entre cartilago y hueso subcondral. Durante el proceso artrósico se produce un incremento en la permeabilidad entre cartilago y hueso a través de las fisuras creadas en el cartilago y la angiogénesis subcondral representado mediante las flechas. A nivel molecular se produce la alteración de diferentes rutas inflamatorias y la liberación de factores inflamatorios. OA: artrosis; pERK: *extracellular-signal-regulated kinases*; p38 MAPK: *P38 mitogen-activated protein kinases*; VEGF: *Vascular endothelial growth factor*; IL-6: interleucina 6; TGF-β1: *Transforming growth factor beta 1*; MMP-13: metaloproteasa 13. Imagen modificada de Lories et al. (2011).

Los ligamentos que forman parte de las articulaciones son un componente más a tener en cuenta cuando se estudia el proceso artrósico. En el caso de la rodilla el estudio de *Hasegawa et al.* muestra como existe una relación entre la degeneración del ligamento cruzado anterior y el cartílago en especial en el compartimento medial de la rodilla ³⁶.

Otra estructura que juega un papel importante en la artrosis de rodilla son los meniscos. El menisco es una estructura articular esencial en la distribución de las fuerzas axiales que actúan sobre la rodilla y en la absorción de los impactos que esta puede sufrir. La extrusión de menisco es una alteración de las funciones del menisco y modifica el equilibrio en la distribución de las cargas generando una inestabilidad articular que acaba provocando múltiples traumas sobre la estructura del hueso subcondral durante el movimiento de la rodilla. Al igual que la esclerosis del hueso subcondral, la extrusión de menisco aparece en fases avanzadas de la enfermedad y se asocia con diferentes alteraciones en los parámetros normales de los componentes estructurales de la rodilla como pueden ser la reducción del espacio articular o la pérdida de cartílago ³⁷⁻³⁹.

La artrosis puede afectar a cualquier articulación del cuerpo humano, aunque las que presentan una mayor prevalencia son principalmente la rodilla, la cadera, las manos y la columna vertebral. En menor medida también pueden verse afectados los pies, los hombros, los codos y las muñecas además en estas articulaciones la artrosis aparece como una patología secundaria a impactos o golpes ⁴⁰ (Tabla 1).

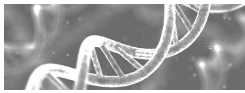


Tabla 1: Prevalencias de la artrosis según las diferentes localizaciones en las que se puede presentar.

Localización de la artrosis	Prevalencia
Cadera	6 – 10 % ²²
Rodilla	30 % ²²
Manos	6 – 20 % ²²
Columna cervical y baja	24 % ²²
Hombro	10 % ⁴¹
Codo	2 % ⁴²
Muñeca	6 % ⁴³
Tobillo y pie	7 % ⁴⁴

1.2.3 Clasificación de la artrosis

Debido a la compleja sintomatología que presenta la artrosis resulta difícil establecer un criterio para clasificar a los pacientes. De esta manera existen diferentes maneras de clasificar a los pacientes en artrósicos o sanos atendiendo a criterios radiológicos y sintomáticos. En el caso de los estudios epidemiológicos podemos clasificar a un paciente con artrosis atendiendo a criterios radiográficos, sintomáticos y/o clínicos:

- **Clasificación radiográfica de la artrosis.** En este caso la artrosis se define a partir de las imágenes radiográficas que permiten asignar los diferentes grados radiológicos que pueden presentar los pacientes y que hacen referencia al grado de afectación que presenta la articulación. La principal escala radiográfica en artrosis es la escala Kellgren-Lawrence (KL)¹¹ que asigna un valor entre 0 y 4 según los signos radiológicos observados (Tabla 2). Normalmente se clasifica a un paciente como artrósico si presenta un grado radiológico KL igual o superior a 2.

Tabla 2: Escala radiológica Kellgren-Lawrence para la clasificación de pacientes artrósicos

Escala Kellgren-Lawrence		
Grado	Clasificación	Características
0	Sano	-Ausencia de signos radiológicos
1	Dudosa	-Posible presencia de osteofitos. -Reducción dudosa del espacio articular.
2	Leve	-Presencia de pequeños osteofitos definidos. -Reducción del espacio articular leve o media.
3	Moderada	-Osteofitos definidos de tamaño medio. -Importante reducción del espacio articular ($\geq 50\%$). -Esclerosis leve.
4	Severa	-Reducción severa del espacio articular. -Numerosos osteofitos. -Esclerosis grave.

Recientemente la *Osteoarthritis Research Society International (OARSI)* realizó una revisión de estos criterios radiológicos para la artrosis de rodilla ⁴⁵ considerando la presencia de dos variables relacionadas con la artrosis como son:

- 1) Presencia de osteofitos marginales en el cóndilo femoral y la tibia de los compartimentos medial y lateral.
- 2) Reducción del espacio articular (*JSN*, del inglés *Joint Space Narrowing*) en los compartimentos medial y lateral.

Cada uno de estos parámetros se gradúa de 0 a 3 según el grado de afectación (Tabla 3).

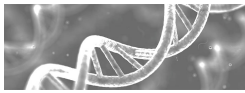


Tabla 3: Escala radiológica OARSI para la clasificación de la artrosis de rodilla.

Escala radiológica OARSI para la artrosis de rodilla		
GRADO	Clasificación JSN (% reducción)	Clasificación osteofitos
0	Normal	Normal
1	Medio (1-33%)	Grado I
2	Moderado (34-66%)	Grado II
3	Severo (67-100%)	Grado III

Esta escala, a diferencia de la KL, evalúa estos dos parámetros de forma independiente.

- **Clasificación sintomática de la artrosis.** Además de los signos radiológicos, existen manifestaciones sintomáticas de la artrosis como pueden ser el dolor y la rigidez articular, entre otros. Considerando estos síntomas junto con las manifestaciones radiológicas se obtiene una definición sintomática de la artrosis. Cuando se utiliza este tipo de definición se debe tener en cuenta que la correlación entre signos radiológicos y dolor⁴⁶ no siempre se corresponde, sino que en muchos casos no existe manifestación sintomática de dolor articular aunque existen signos radiológicos de la enfermedad en la articulación afectada⁴⁷.

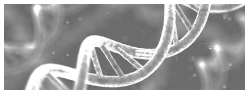
- **Clasificación clínica de la artrosis.** Otra manera de diagnosticar la enfermedad es basarse exclusivamente en la información clínica de cada paciente, es decir, a través de la historia clínica y de un examen físico se puede establecer el diagnóstico de los pacientes.

Debido a las diferentes metodologías de diagnóstico que se pueden aplicar en la artrosis se hace necesario unificar los criterios de inclusión de los pacientes artrósicos. Para ello el *American College of Rheumatology (ACR)* establece unos criterios que agrupan tanto manifestaciones sintomáticas como clínicas y radiológicas que permiten llevar a cabo el diagnóstico de pacientes con artrosis de rodilla, cadera o manos⁴⁵ (Tabla 4).

Tabla 4: Criterios Radiológicos y clínicos del *American College of Rheumatology (ACR)* para el diagnóstico de la artrosis de rodilla, cadera y manos.

RODILLA	CADERA	MANO
Se debe dar alguna de las siguientes combinaciones de factores: 1-2 // 1-3-5-6 // 1-4-5-6.	Se debe dar alguna de las siguientes combinaciones de factores: 1-2 // 1-2-3 // 1-3-4.	Se debe dar alguna de las siguientes combinaciones de factores: 1-2-3-4 // 1-2-3-5.
1 Dolor de rodilla en la mayoría de los días del mes anterior.	1 Dolor de cadera en la mayoría de los días del mes anterior.	1 Dolor o rigidez en la mano en la mayoría de los días del mes anterior.
2 Osteofitos marginales asignados radiográficamente	2 Velocidad de sedimentación globular (VSG) \leq 30 mm/h	2 Engrosamiento de las estructuras óseas de 2 o más de 10 articulaciones seleccionadas*
3 Fluido sinovial característico de artrosis	3 Radiografía femoral o acetabular con presencia de osteofitos	3 Inflamación en 2 o más articulaciones metacarpofalángicas
4 Edad \geq 40 años	4 Reducción del espacio articular asignada radiográficamente	4 Engrosamiento de 2 o más articulaciones interfalángicas distales
5 Crepitación en la movilización activada de la rodilla		5 Deformaciones en de 2 o más de las articulaciones de la mano seleccionadas*
6 Rigidez matutina de duración inferior a 30 minutos		

* Diez articulaciones seleccionadas incluyendo la 2ª y 3ª interfalángicas proximales, 2ª y 3ª interfalángicas distales y la 1ª metacarpal.



1.2.4 Técnicas de imagen en la clasificación de la artrosis.

Radiografía

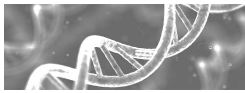
El avance en las nuevas técnicas y metodologías de imagen incrementa las posibilidades de detectar la artrosis en sus fases iniciales y permite realizar un seguimiento exhaustivo del avance de la patología en estudios de progresión. La técnica de rayos X es la metodología aceptada internacionalmente en la determinación y confirmación de la patología artrósica, tanto a nivel clínico como de investigación ⁴⁸. Es una técnica sencilla y económica que permite la visualización directa de los signos característicos de la artrosis: los osteofitos marginales, la esclerosis subcondral y los quistes subcondrales ^{45,49}. A esto hay que añadir que las imágenes obtenidas son fáciles de interpretar permitiendo establecer una estandarización de los diagnósticos a través de las diferentes escalas de graduación (*KL, OARSI ...*) para la clasificación de la artrosis ⁵⁰ (Figura 4).

Sin embargo esta técnica presenta una serie de limitaciones e inconvenientes entre los que se encuentran el ser invasiva y dañina ya que un uso rutinario y frecuente de la misma puede provocar mutagénesis y tumorigénesis ⁵¹. Por otro lado es una técnica que no nos permite evaluar los cambios incipientes en la integridad del cartílago ni realizar un seguimiento y evolución en la progresión de los mismos ya que no es posible visualizar tejidos blandos como el cartílago ⁵²⁻⁵⁴. La radiografía sólo ofrece una estimación indirecta del grosor y de la integridad del cartílago a través de la medición de la reducción del espacio articular ^{55,56}. Además las imágenes radiográficas obtenidas dependen de la posición del paciente en el momento de la adquisición de las mismas y un mal alineamiento de las articulaciones puede generar errores a la hora de interpretar las radiografías obtenidas ⁵⁷ y afectar a los valores de parámetros radiográficos cuantitativos como pueden ser la anchura de espacio articular (*JSW, del inglés "joint space width"*) ⁵⁸.



Figura 4: Representación de los cambios morfológicos articulares asociados al grado de afectación articular. Imágenes radiográficas de las articulaciones de rodilla, cadera y mano, correspondientes a articulaciones sanas, artrósicas con grado de afectación medio y artrósicas con un grado de afectación severo.

Además del valor como herramienta diagnóstica la técnica de rayos X también es válida como herramienta de pronóstico para la progresión en la artrosis. *Reijman et al.* en un estudio de seguimiento de seis años de duración encuentran que el factor predictivo de progresión en artrosis de cadera más



robusto es el grado radiológico *KL* de inicio. Esta asociación es incluso más significativa en los pacientes que presentan dolor de cadera en el tiempo inicial del estudio ⁵⁹.

Otro de los factores de riesgo que afectan a la progresión de la artrosis de rodilla es el alineamiento articular en cualquiera de sus formas varus o valgus, que se determinan mediante radiografías, por lo que se puede emplear como factor pronóstico ^{60,61}. Otros trabajos reafirman el papel del alineamiento articular como factor independiente de riesgo en la progresión de la artrosis de rodilla ⁶². También existen asociaciones con otros factores de riesgo como en el trabajo de *Brouwer at al.* en el que encuentran una asociación del varus con el desarrollo y la progresión en la artrosis de rodilla siendo esta asociación más importante en las personas con sobrepeso y obesas⁶³.

Resonancia magnética

La resonancia magnética aplicada a la artrosis supone un avance en los aspectos limitantes que presentan las radiografías ya que, además de ser una metodología no invasiva y sin efectos nocivos sobre la salud, posibilita la obtención de un gran número de imágenes de toda la articulación en su conjunto, incluyendo los tejidos blandos, con unos elevados niveles de definición y precisión de las estructuras que la conforman ⁶⁴. Gracias a este nivel de definición y calidad de las imágenes se pueden evaluar cambios mínimos en la estructura y en las propiedades de cualquiera de estas estructuras en los diferentes planos en que se puede aplicar la técnica pudiendo observar los cambios morfológicos asociados al inicio de la artrosis⁶⁵ (Figura 5).

A través de las imágenes obtenidas se puede evaluar y medir características morfológicas del cartílago hialino, siendo el volumen y el grosor las principales magnitudes estudiadas en el diagnóstico y progresión de la artrosis ⁶⁶⁻⁶⁸.

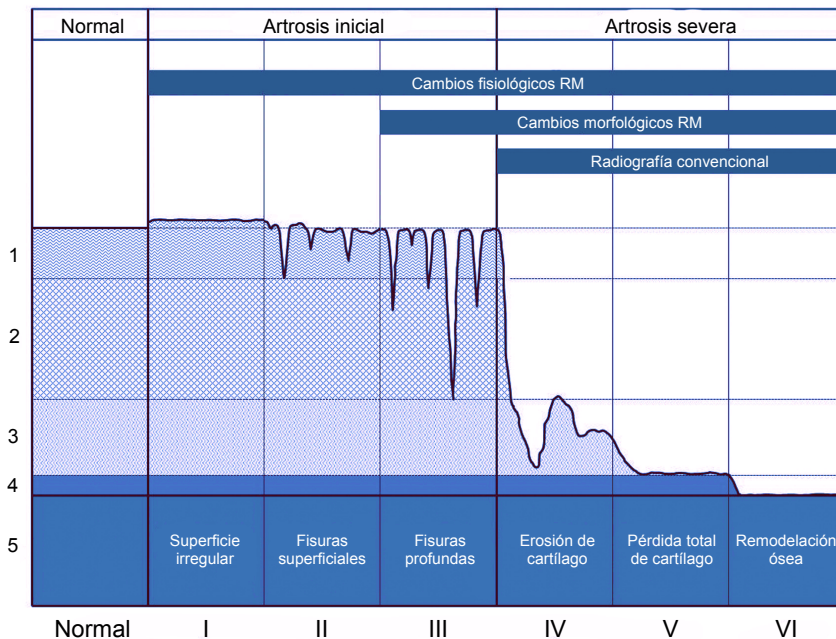
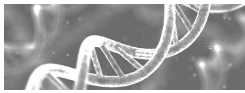


Figura 5: Representación de los cambios fisiológicos y morfológicos que sufre el cartílago articular según la graduación de la escala OARSI (Pritzker, 2006). La figura muestra la sensibilidad de las técnicas de resonancia magnética y de radiografía convencional a dichos cambios. 1: Zona superficial; 2: Zona intermedia; 3: Zona profunda; 4: Límite cartílago-hueso; 5: Hueso subcondral. (Imagen adaptada de Palmer et al. 2013).

La mayor sensibilidad para visualizar los cambios morfológicos articulares así como la capacidad de poder visualizar tejidos blandos hacen que, por medio de esta técnica, sea posible detectar una pérdida en el volumen de cartílago sin que se observen alteraciones en la disminución del espacio articular (*JSW*) determinado a través de imágenes radiográficas ⁵⁴; así se estima que se produce una reducción de un 4 y un 6% del volumen y del grosor de cartílago por año, respectivamente, en el caso de la artrosis de rodilla ⁶⁹. La resonancia magnética también permite la medición precisa de las variaciones que se producen en el *JSW*.

Dos de los parámetros obtenidos mediante resonancia magnética que nos aportan información de la estructura de los componentes de la articulación son los tiempos de relajación T1 y T2. Básicamente consisten en que cuando la materia que compone un material, en este caso los tejidos articulares, se somete a un campo magnético adecuado los núcleos de los átomos con un



número impar de protones o neutrones que la componen absorben energía y pasan a un estado que se denomina “resonancia”. Esta energía es liberada en forma de radiofrecuencia en un proceso llamado “relajación”. Los tiempos T1 y T2 miden la rapidez o la lentitud que tardan en recuperar el estado inicial los núcleos resonantes y se ven condicionados por el resto de átomos que rodean al núcleo resonante viendo modificadas sus características de movimiento físico. Debido a esto se definen como T1 el tiempo de relajación longitudinal y como T2 el tiempo de relajación transversal. El estudio de los tiempos de relajación T1 y T2 permite, por un lado, obtener información sobre los componentes de colágeno y proteoglicanos que conforman la matriz del cartílago hialino y, por otro lado, evaluar su integridad en toda su morfología ⁷⁰. Varios estudios han determinado la cantidad y la organización de las fibras de colágeno dentro de la matriz del mismo utilizando el tiempo T2. El tiempo T1 permite visualizar los cambios que se producen en el contenido y la distribución de proteoglicanos dentro del cartílago articular permitiendo detectar las primeras fases de la artrosis ⁷¹ (Figura 6).

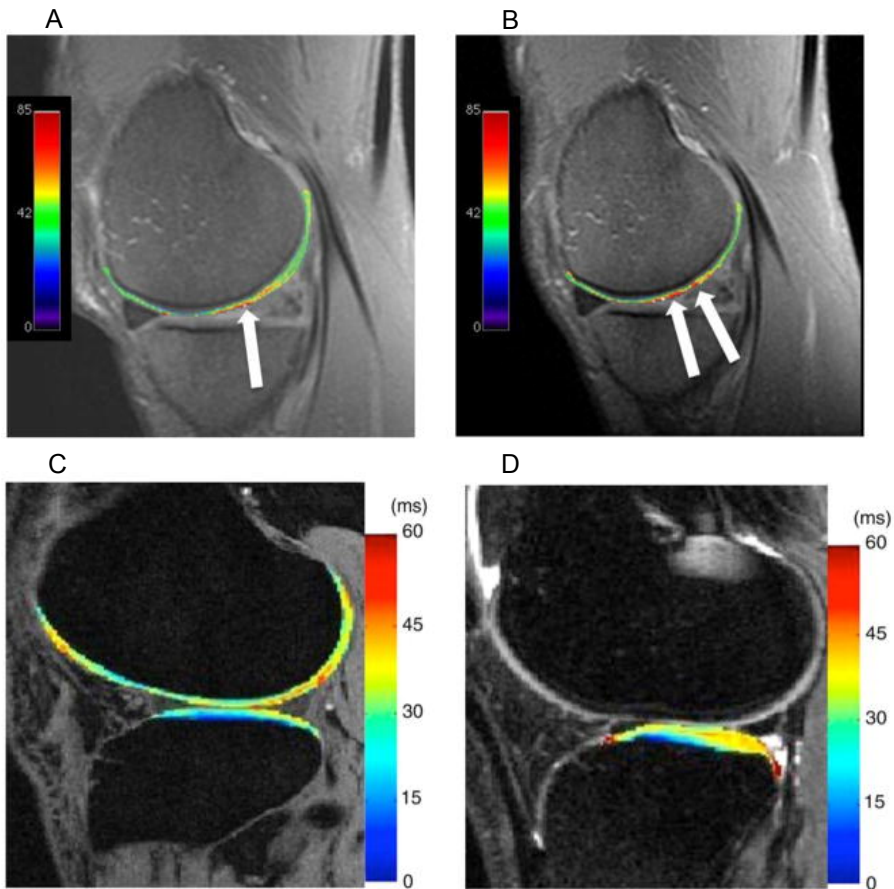
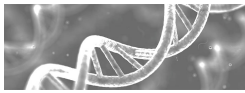


Figura 6: Utilidad de los tiempos T1 y T2. El aumento del tiempo T2 en el cartílago articular se relaciona con la integridad del cartílago pudiendo seguir su evolución en el tiempo, tal como muestran las imágenes A y B, tomadas en dos tiempos diferentes, y que corresponden a un paciente con artrosis de rodilla en la zona medial del fémur. Las imágenes C y D, obtenidas de la representación gráfica del tiempo T1, muestran los cambios en la rodilla de un paciente durante un periodo de seguimiento de un año, correspondiendo C a una rodilla sana y D a la misma rodilla dañada. El incremento en el tiempo T1 se relaciona con un menor contenido de proteoglicanos. (imagen adaptada de *Braun et al. 2012*) ms:milisiemens.

Basándose en las imágenes de resonancia magnética obtenidas por el consorcio de la *Osteoarthritis Initiative (OAI)* *Urish et al.* describen la aplicación del tiempo T2 para predecir qué pacientes van a empeorar sus índices *WOMAC* (*Western Ontario and McMaster's Osteoarthritis Index*) en un periodo de seguimiento de 3 años ⁷². Para llevar a cabo el estudio este grupo utiliza el mapa T2 del cartílago de cada paciente para definir el índice de textura de cartílago T2 obtenido a partir de las imágenes de resonancia magnética. El



índice T2 de textura de cartílago se puede definir por tanto como un biomarcador de empeoramiento en el índice *WOMAC* de los pacientes con artrosis de rodilla con un grado de precisión en su predicción situado entre el 71 y 76%.

A partir de las imágenes obtenidas mediante esta técnica se han desarrollado índices numéricos para valorar el estado de afectación de la articulación, el índice *WORMS (Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score)*, así como las lesiones a nivel de médula ósea, el índice *BLOKS (Boston Leeds Osteoarthritis Knee Score)* ^{73,74}. Existen también otros métodos semicuantitativos que evalúan el estado de la articulación de manera global, del cartílago, de los ligamentos, de los meniscos, de las lesiones en la médula etc como pueden ser el índice *KOOS (Knee Osteoarthritis Scoring System)* en el caso de la artrosis de rodilla o el índice *HOAMS (Hip Osteoarthritis Magnetic Resonance Imaging Scoring System)* en la artrosis de cadera ^{48,75}.

Sin embargo la resonancia magnética presenta dos limitaciones principales; la primera es el coste económico para su aplicación clínica, la segunda es que no existen valores estandarizados para evaluar cuándo los cambios observados en el cartílago, o en las estructuras que conforman la articulación, son suficientes para considerar un cambio en el grado de afectación. Es una técnica con un alto potencial pero en la actualidad se utiliza más en la investigación que en la clínica aunque es posible que, a medida que se avance en la interpretación de los resultados obtenidos, se extienda su uso rutinario en la clínica permitiendo realizar diagnósticos tempranos de la patología y explorar nuevas vías de tratamiento ^{69,76}. En este sentido la *OAI* (iniciativa multicéntrica que se desarrolla en un apartado posterior de esta tesis) tiene como uno de sus principales objetivos el desarrollar y validar biomarcadores estructurales de imagen en la artrosis de rodilla utilizando para ello imágenes de resonancia magnética ⁷⁷.

Esta técnica presenta, además de su uso clínico, una aplicación directa en la búsqueda de biomarcadores. Algunos de los parámetros medibles mediante esta técnica como son el grosor de cartílago y el volumen del mismo sirven para definir la presencia y la progresión en la artrosis.

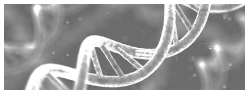
Eckstein et al. establecen que la pérdida en el grosor de cartílago en la zona central y medial de la rodilla se asocia significativamente con la progresión en la patología artrósica durante un periodo de seguimiento de cuatro años. Además las diferencias en la pérdida de grosor de cartílago son más notables en las etapas iniciales de la patología que en fases avanzadas de la misma ⁶⁶.

Tal y como se describió anteriormente, otro parámetro implicado en la artrosis es el menisco, que tiene una función clave de reparto de peso y presiones en la rodilla. Por eso los daños en su morfología y el desplazamiento de su posición natural se presentan como dos factores de riesgo en la progresión de la artrosis de rodilla ya que se relacionan con una pérdida de cartílago articular siendo la técnica de imagen utilizada la resonancia magnética ⁷⁸.

Las imágenes de resonancia magnética permiten además detectar lesiones en la médula ósea de la rodilla que se relacionan con la pérdida de cartílago. Hay estudios que relacionan la aparición de nuevas lesiones en la médula ósea con el alineamiento de la rodilla ⁷⁹. Dos estudios longitudinales muestran que las lesiones en la médula ósea se asocian con la progresión en la artrosis de rodilla como factor de riesgo en la pérdida de volumen de cartílago durante un periodo de seguimiento de dos años, además la severidad en las lesiones también se asocia con la progresión a prótesis en un periodo de seguimiento de cuatro años ^{80,81}. Por su parte *Wluka et al.* realizan un estudio de seguimiento de dos años en mujeres sanas de artrosis de rodilla y relacionan la presencia de lesiones en la médula ósea, en el tiempo inicial de estudio, con defectos y pérdida de cartílago ⁸².

Ultrasonografía

La aplicación de los ultrasonidos para obtener imágenes de las articulaciones es una técnica que permite visualizar imágenes a tiempo real y desde múltiples planos sin exponer al paciente a radiaciones. La ultrasonografía es una técnica ampliamente utilizada en la investigación y la clínica de las enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide ⁸³ y,



además, mediante esta técnica se pueden estudiar los diferentes parámetros y variables relacionados con la artrosis, incluidos los cambios estructurales articulares y la inflamación, sin ser necesaria la administración de ningún tipo de contraste para tal fin ⁸⁴. Actualmente, la mayor aplicación de la ultrasonografía en artrosis se da en la artrosis de manos ⁸⁵. La principal limitación de esta técnica viene dada por la propia naturaleza física de las ondas del sonido, de manera que se pueden visualizar los componentes superficiales articulares pero no así las estructuras articulares profundas. Además, es una técnica altamente dependiente del operador del aparato por lo que resulta difícil establecer protocolos estandarizados de aplicación de la misma ⁴⁸.

Sin embargo presenta un importante potencial de desarrollo de cara al futuro ya que, por ejemplo, la determinación de la presencia de sinovitis, que puede ser un factor predictivo para la progresión de la artrosis convierte a la ultrasonografía en una herramienta útil en el estudio de esta enfermedad⁶⁵.

Tomografía computerizada

La tomografía computerizada (TC) puede considerarse una técnica más útil que la resonancia magnética desde el punto de vista de que permite evaluar la morfología del hueso y las calcificaciones de los tejidos blandos ⁸⁶.

La realización de la artrografía a través de la TC permite evaluar, con gran resolución anatómica, el daño superficial del cartílago articular a través de múltiples planos, siendo además una técnica ideal para representar los osteofitos y la esclerosis en el hueso subcondral ⁸⁷. Sin embargo, esta técnica debido a que supone una invasividad importante sobre la articulación, además del riesgo que supone hacer una inyección intra-articular, la convierten en una técnica poco empleada tanto a nivel clínico como epidemiológico ⁴⁹.

1.3 PREVALENCIA DE LA ARTROSIS

Debido a la naturaleza multifactorial de la artrosis así como a las diversas manifestaciones de la misma, además de las diferentes articulaciones que se pueden ver afectadas, hace que resulte difícil establecer unos valores universales de prevalencia para esta patología. Existen diferentes estudios de prevalencia sobre la artrosis realizados en diversas poblaciones mundiales que obtienen unos porcentajes similares para la artrosis de rodilla, cadera y manos, aunque cada población presenta unas características propias que hacen que estos valores varíen ligeramente.

En el caso de la población española, el estudio EPISER (Prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española) es el que establece la principal referencia sobre la prevalencia de las enfermedades reumáticas más frecuentes entre las que se encuentra la artrosis. Este estudio fue llevado a cabo por la Sociedad Española de Reumatología (SER) a través de una encuesta poblacional en donde se utilizaron los criterios clínicos, no radiológicos, del *ACR* para la definición de la artrosis de rodilla y manos. Los valores de prevalencia obtenidos fueron de un 10% para la artrosis de rodilla y de un 6,2% para la artrosis de manos en la población general.

Estas prevalencias varían según la edad y el sexo (Figura 7) ⁸⁸. Así, se observa que la prevalencia de la artrosis aumenta con la edad, incrementándose notablemente en el intervalo de los 50 a 70 años y alcanzando su valor máximo en la franja de los 70-79 años ⁸⁹. Mientras que en el caso del sexo nos indica que el sexo femenino es el que presenta mayor prevalencia independientemente de la edad ⁹⁰. Una estimación del porcentaje de riesgo de padecer artrosis de rodilla muestra un valor del 40% en el caso de los hombres y un 47% en el de las mujeres ⁹¹.

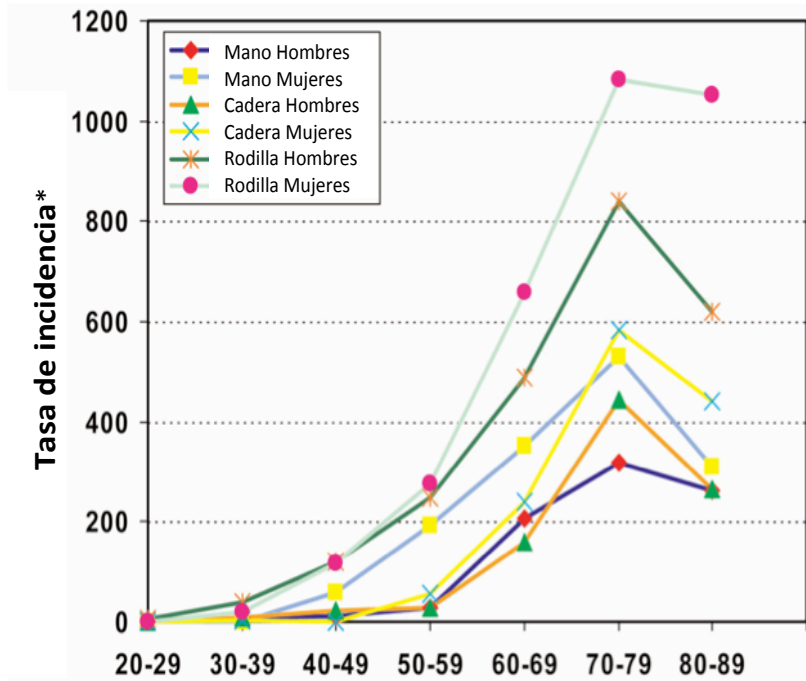
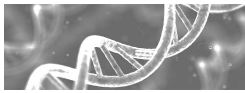


Figura 7: Incidencia de la artrosis de manos, cadera y rodilla por sexo y edad. * por cada 100000 personas y año. Imagen adaptada de Oliveira et al. 1995.

Cuando se hace referencia a la prevalencia de la artrosis es necesario indicar a qué tipo de artrosis y qué definición de la misma se hace, ya que los porcentajes variarán según estos parámetros. De esta manera *Pereira et al* encuentran unos porcentajes de prevalencia de artrosis mayores cuando se utiliza el criterio radiográfico para definir la artrosis en comparación con el criterio sintomático (artrosis radiográfica y presencia de dolor)⁹². Acorde con el anterior trabajo, el “*Framingham Osteoarthritis Study*” muestra un porcentaje del 19% para la artrosis radiográfica de rodilla mientras que para la misma población el porcentaje de artrosis sintomática de rodilla baja hasta el 7%⁹³.

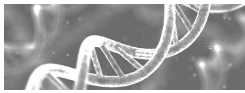
Globalmente, los valores de artrosis obtenidos en el trabajo de revisión de *Pereira et al.* fueron de un 43% en la artrosis de manos, un 24% para la artrosis de rodilla y un 11% en la artrosis de cadera considerando conjuntamente los criterios radiológico y sintomático, basándose en los datos obtenidos en estudios realizados sobre diferentes poblaciones mundiales. En el

caso de Estados Unidos, los datos reflejan que en el año 2008 había en torno a 27 millones de personas afectadas de artrosis ¹². La tabla 5 muestra algunos porcentajes de prevalencia de artrosis de rodilla y cadera obtenidos en diferentes estudios poblacionales ^{89,94,95}.

Tabla 5: Prevalencia de las artrosis de cadera y rodilla en diferentes poblaciones mundiales

CONTINENTE	PAIS	PREVALENCIA (%)	
		OAR	OAC
ÁFRICA	Togo	8	-
AMÉRICA	Estados Unidos	37	5,5
EUROPA	Grecia	6	1
	Italia	30	7,7
	Reino Unido	18	8
ASIA	China	42	2
OAC: artrosis de cadera; OAR: artrosis de rodilla. Ref: Litwic et al. 2013; Peña-Ayala et al. 2007; Cooper et al. 2014.			

De cara al futuro las perspectivas son que el número de personas que sufran artrosis se incremente, debido sobre todo al envejecimiento de la población como consecuencia del aumento de la esperanza de vida y al incremento de la obesidad en la población general ⁹⁶. Baste como ejemplo la población de Estados Unidos; en el año 2005 había 22 millones de personas que presentaban artrosis sintomática y se estima que este valor será el doble en el año 2030 ⁹⁷.



I.4 IMPACTO SOCIO-ECONÓMICO DE LA ARTROSIS

El impacto socio-económico de la artrosis en los países desarrollados se ha visto incrementado en las últimas décadas conforme ha ido aumentando la esperanza de vida y consecuentemente se ha producido el envejecimiento de la población ⁹⁸.

La influencia de la artrosis sobre la economía se manifiesta fundamentalmente a través de dos vías; la primera, debida a la actividad laboral, ya sea a través de las bajas solicitadas por los pacientes o bien por un menor rendimiento en el trabajo, sobre todo para aquellas actividades que conllevan un esfuerzo para las articulaciones; la segunda vía se asocia a los gastos generados a nivel clínico tanto en consultas primarias y especializadas como de tratamientos y cirugías ^{97,99}.

Las enfermedades reumáticas suponen entre un 10 y un 20% de las consultas de atención primaria en Europa ¹⁰⁰. En España se calcula que un 33% de la población acude anualmente a las consultas médicas por problemas musculoesqueléticos ⁹⁰. En el Reino Unido se estima en un 5% el porcentaje de la población que acude a consultas de atención primaria debido a problemas musculoesqueléticos. En total, el número de consultas diarias asciende a las 100.000, representando un elevado coste. Aproximadamente un tercio de la población del Reino Unido mayor de 45 años ha tenido o tiene tratamiento para la artrosis en algún momento de su vida ¹⁰¹.

La artrosis se sitúa entre las principales causas de discapacidad en los países desarrollados ⁹⁶, siendo además una de las principales causas de hospitalización; en el año 2009 en Estados Unidos se situó como la cuarta causa de hospitalización entre la población general ^{102,103}. En España el estudio EPISER junto con las encuestas Nacionales de Salud muestran resultados similares, las enfermedades reumáticas representan la primera causa de morbilidad en la población, siendo la artrosis la patología articular más frecuente. Su elevada prevalencia conlleva un elevado coste a nivel socio-económico ya que a los gastos generados por bajas laborales e incapacidades

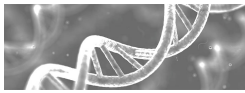
hay que sumar los derivados de reemplazos articulares mediante prótesis. Así, en Estados Unidos durante el año 2004 se realizaron alrededor de 500.000 reemplazos articulares primarios, mientras que en el año 2009 este número llegó a los 900.000 con un coste de 42,3 billones de dólares ¹⁰². Se estima, además, que en el año 2030 este número ascienda a los 3,5 millones de reemplazos articulares.

Aproximadamente el 20% de las bajas laborales totales se asocia a patologías reumáticas y dentro de ellas destaca la artrosis debido a su prevalencia, aunque es difícil establecer un porcentaje concreto puesto que en muchos casos es muy complicado clasificar los procesos artrósicos como tales. Como ejemplo de la importancia de la artrosis en los procesos de bajas laborales basta fijarse en el dato de que entre los años 1990 y 2010 se ha producido un incremento del 16% en las bajas laborales asociadas a la patología artrósica en el Reino Unido ¹⁰⁴. Además se han asociado las bajas por incapacidad temporal de más larga duración con padecer artrosis ¹⁰⁵.

Otro dato a destacar es que los costes acumulados por las artrosis de rodilla y cadera representaron en el año 2007 aproximadamente un 0,5% del PIB español ¹⁰⁶. Los costes generados por las incapacidades permanentes causadas por las enfermedades reumáticas son mayores incluso que los causados por cardiopatías. Además de los efectos mórbidos asociados a la artrosis, se ha descrito un valor de 1,55 para la razón de mortalidad estandarizada en aquellos pacientes que padecen artrosis de cadera o de rodilla, de modo que los pacientes artrósicos presentan un mayor riesgo de muerte que la población general, siendo la diabetes, el cáncer, las patologías cardiovasculares y la incapacidad para andar los principales factores de riesgo asociados a esta mortalidad además del ser hombre y la edad ¹⁰⁷.

1.5 FACTORES DE RIESGO

La artrosis es una patología de origen multifactorial en la que normalmente intervienen más de uno de los factores implicados simultáneamente. Entre los principales factores de riesgo de desarrollar



artrosis se pueden citar la edad, el sexo, la raza, la obesidad, la ocupación laboral, la nutrición, el hábito tabáquico, los factores genéticos, los daños articulares causados por impactos sobre la articulación etc ⁸⁹. Existen diversas maneras de clasificar estos factores atendiendo a su naturaleza, una de ellas es considerar aquellos que son modificables frente a los que no lo son (figura 8).

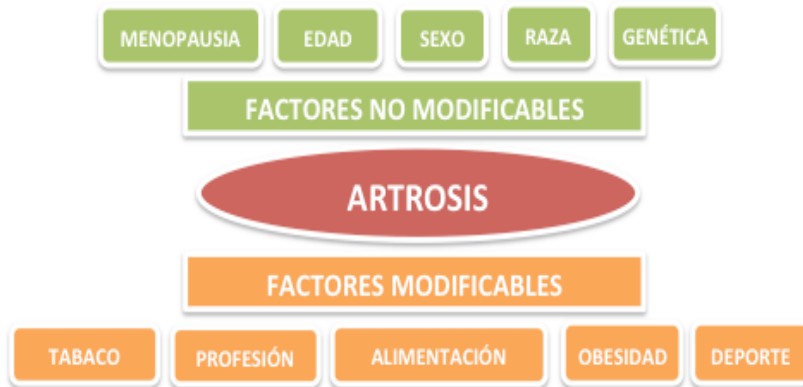


Figura 8: Principales factores de riesgo asociados a la artrosis.

1.5.1 Factores no modificables

Edad

La edad es el principal factor de riesgo de padecer artrosis; tanto la artrosis radiográfica como la sintomática presentan una mayor prevalencia e incidencia con la edad ^{93,108}. Sin embargo el mecanismo específico por el que se relacionan la edad y la artrosis sigue siendo desconocido, aunque existen diversas teorías que proponen modelos aproximados de cuál podría ser dicho mecanismo o mecanismos celulares ¹⁰⁹.

Uno de estos modelos es el que trata de explicar la relación entre edad y artrosis a través de la senescencia celular. Para ello tiene en cuenta que, a diferencia de otros tipos celulares, los condrocitos poseen una baja capacidad replicativa y por ello su senescencia no es del tipo replicativo sino del tipo secretor, ya que los condrocitos sí poseen una elevada capacidad secretora. Así, la producción de MMP-13 estimulada por la IL-1 β se incrementa con la edad

por lo que sugiere que con la edad los condrocitos adquieren el modelo de senescencia secretora ¹¹⁰.

Otro mecanismo es el que relaciona los productos finales de glicación con el debilitamiento del cartílago a través de la alteración de sus propiedades mecánicas. El condrocito posee receptores específicos para estos productos finales de glicación desencadenando una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias y metaloproteasas ^{111,112}.

La influencia de la edad sobre la prevalencia e incidencia de la artrosis tiene un carácter multifactorial entre los que se encuentran el daño oxidativo, la disminución del grosor del cartílago y el debilitamiento muscular, entre otros. A todo ello hay que añadir que, con la edad, se produce una alteración de los procesos de mantenimiento y reparación celulares, que son los encargados de conservar la homeostasis a nivel articular. Esta alteración provoca una respuesta ineficiente del cartílago articular sometiendo a un sobreesfuerzo al resto de la articulación, degenerando a su vez la estructura del cartílago en un proceso de retroalimentación ⁸⁹. Este modelo de degeneración global de la articulación refuerza la hipótesis de que no es la edad la que actúa sobre el cartílago como factor un iniciador del proceso artrósico, ya que además en muchos casos no existen manifestaciones sintomáticas, radiográficas, macroscópicas o microscópicas de la artrosis incluso en pacientes de edad avanzada (Figura 9) ¹¹³.

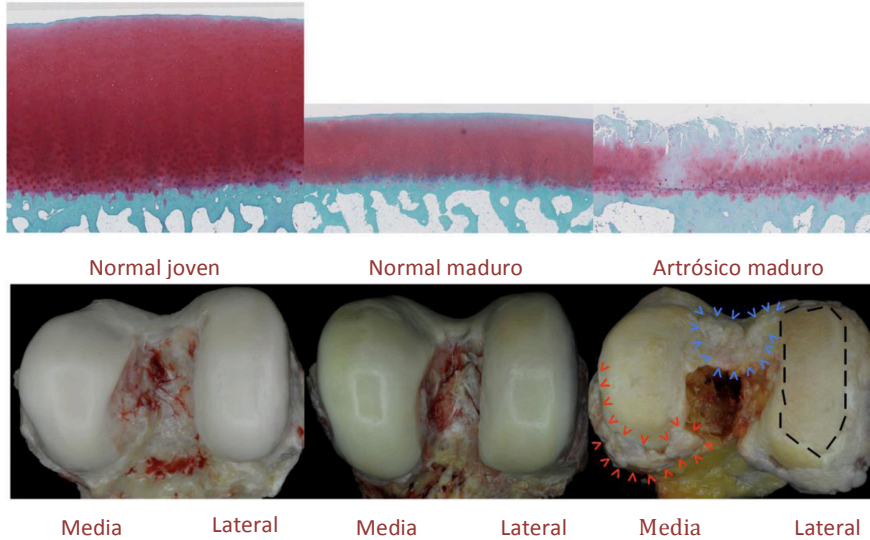
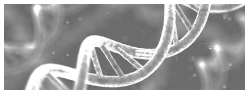


Figura 9: Representación gráfica de la influencia de la edad sobre el cartílago articular. Zona superior: Tinción de varias secciones de cóndilos femorales humanos con safranina-O. Zona inferior: Imágenes de tres cóndilos femorales humanos. La línea discontinua negra señala una zona con pérdida de cartílago. Los indicadores rojos resaltan los osteofitos formados en el margen de la articulación. Los indicadores azules marcan la unión entre los cóndilos. Normal joven (<40 años), normal maduro (76 años) y artrósico maduro (88 años). *Imagen adaptada de Lotz et al. 2012.*

Sexo

Otro de los factores no modificables relacionados con la artrosis es el género al que se pertenece. Así, la prevalencia de la artrosis es mayor en las mujeres que en los hombres (figuras 7 y 10) presentando además unos grados de severidad radiográfica mayores ¹¹⁴. Asimismo, un trabajo reciente de *Maleki-Fischbach et al.* encuentra que las mujeres presentan un menor grosor de cartílago que los hombres, después de ajustar por peso, altura y tamaño de hueso en cada grupo ¹¹⁵.

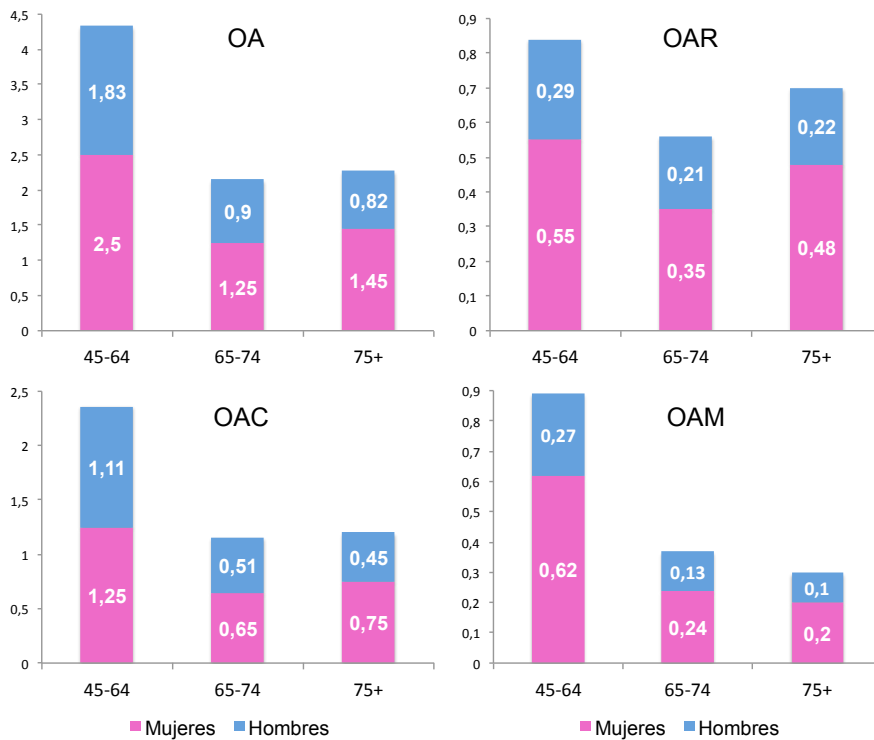
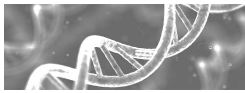


Figura 10: Representación de la distribución del número de pacientes diagnosticados artrósicos por tipo de artrosis y sexo al que pertenecen. Se puede observar que en todos los tipos de artrosis el sexo femenino es el que muestra un mayor número de casos. En el eje vertical se representan los millones de casos. OA: artrosis; OAC: artrosis de cadera; OAR: artrosis de rodilla; OAM: artrosis de manos. Datos obtenidos de la guía “Osteoarthritis in general practice” de la *Arthritis Research UK*.

Si nos centramos en las mujeres post-menopáusicas, la asociación estadística se fortalece mostrando unos porcentajes de prevalencia mayores en el sexo femenino ⁸⁸. Teniendo en cuenta este dato, cobra fuerza la hipótesis de que los estrógenos pueden tener un papel clave dentro de la artrosis ¹¹⁶. Se han realizado diferentes trabajos en donde se investiga sobre esta hipótesis, sin embargo no hay una conclusión clara puesto que se obtienen resultados contradictorios según el estudio ¹¹⁷⁻¹²⁰.

Raza

La raza o procedencia étnica es una característica intrínseca de la población que puede relacionarse con la predisposición a desarrollar artrosis.



Se observa una variación en los porcentajes de riesgo asociados a las diferentes poblaciones mundiales ¹²¹.

Recientemente *Nelson et al.* en un estudio transversal llevado a cabo en población Norteamericana, observaron diferencias en la predisposición a padecer artrosis en función de la raza y el sexo de los pacientes. En este estudio se trabaja con cuatro tipos de artrosis: manos, rodilla, cadera y lumbar, o diferentes combinaciones de las mismas. Así la población Afroamericana presenta menos probabilidad de padecer artrosis de manos que la población caucásica, pero por contra tiene más posibilidades de padecer artrosis de rodilla ¹²². Además dentro de la población Norteamericana, los afroamericanos presentan más síntomas para la artrosis de cadera y rodilla que los individuos pertenecientes a la raza caucásica ¹²³.

El estudio *Beijing Osteoarthritis Study* realizado sobre una población de origen asiático encontró diferencias en la prevalencia de las artrosis de mano, rodilla y cadera entre la población de estudio comparándola con la de origen caucásico. Así las artrosis de mano y cadera presentan una menor prevalencia en la población asiática que en la caucásica ^{124,125}. Sin embargo estos porcentajes se invierten en el caso del género femenino en la artrosis de rodilla ^{126,127}.

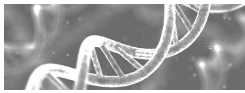
Si tenemos en cuenta la procedencia étnica como factor pronóstico en la progresión de la artrosis, *Kopec et al.* encontraron que la población afroamericana presenta una menor incidencia a la hora de desarrollar artrosis de cadera pero, por el contrario, manifiesta una mayor susceptibilidad en cuanto a la progresión en el caso de la artrosis de rodilla, basándose en los resultados obtenidos sobre una población rural norteamericana ¹²⁸. Este estudio concuerda con los resultados obtenidos por *Mazzuca et al.* en el que los pacientes afroamericanos presentaban un riesgo tres veces mayor de desarrollar osteofitos y JSN que los pacientes de otras razas, mayoritariamente caucásica, durante un periodo de seguimiento de treinta meses ¹²⁹.

Genética

Se estima que la artrosis posee un componente hereditario que se sitúa en torno al 40 - 65%, variando los porcentajes en función de la articulación afectada ¹³⁰⁻¹³². Los avances en la genética de la artrosis se han orientado hacia la búsqueda de marcadores diagnóstico y pronóstico que permitan una detección temprana de la patología y de su posible evolución en el tiempo. Dichos avances se han centrado en la búsqueda de biomarcadores.

El estudio del componente genético de la artrosis ha sufrido un fuerte impulso en las últimas décadas debido fundamentalmente a los avances técnicos que se han logrado en el campo de la genética. Así, se ha pasado del estudio de pequeños fragmentos de genes candidatos a la obtención de genomas completos en tiempos de trabajo relativamente cortos. Estos avances han permitido establecer una serie de genes y posiciones polimórficas dentro de ellos como posibles biomarcadores genéticos de la enfermedad.

Uno de los principales candidatos a funcionar como biomarcador en la artrosis es el gen GDF5 ya que es uno de los pocos genes que se ha asociado con la artrosis en diferentes estudios, incluidos los estudios de asociación de genoma completo. El GDF5 es un gen relacionado con la homeostasis articular y regula la expresión de diferentes genes anabólicos del cartílago articular ¹³³, como son por ejemplo el gen COL2A1, que codifica para el colágeno II, y el gen ACAN que codifica para el agregano ¹³⁴, componentes básicos en la composición del cartílago hialino. Diferentes autores han comprobado la existencia de un polimorfismo situado en la región promotora del gen GDF5 que provoca una reducción de su expresión y un aumento de la susceptibilidad a padecer artrosis ¹³⁵⁻¹³⁷. En un trabajo de reciente publicación *Dodd et al.* identificaron una transversión localizada en el inicio de la zona de transcripción del gen que puede regular sus niveles de expresión aún presentando la variante polimórfica relacionada con la artrosis ¹³⁸. Esto abre una vía de desarrollo para la búsqueda de tratamientos farmacológicos que puedan frenar el avance de la artrosis o incluso prevenirla siendo esta una línea de trabajo enfocada hacia la medicina personalizada. La presencia del polimorfismo perteneciente al gen GDF5 también ha sido relacionado con grados *KL* más severos en la artrosis de rodilla,



por lo que puede ser utilizado como un factor de predicción en la progresión de la artrosis ¹³⁹. Recientemente también se ha descubierto un mecanismo de actuación del gen GDF5 sobre la ruta Wnt que la inhibe. A partir de la estimulación con concentraciones crecientes de GDF5 en cultivo de condrocitos se inhibe la expresión de los enzimas de degradación MMP-13 y ADAMTS4, a la vez que aumentan los niveles de expresión de los genes anabólicos ACAN y SOX9 y se inhibe la ruta Wnt al provocar la expresión de los inhibidores de esta ruta DKK1 y FRZB ¹⁴⁰.

Dentro de este componente genético también se encuentran diferentes genes de la familia SOX. Esta familia de genes codifican para factores de transcripción pertenecientes a una superfamilia de genes que se caracterizan por poseer una secuencia homóloga que se llama *HMG-box (High Mobility Group)* y que está altamente conservada en las células eucariotas. Los genes de la familia SOX desempeñan diferentes funciones como la determinación del sexo o el desarrollo neuronal entre otras. En el caso de la artrosis los genes de la familia SOX actúan sobre la diferenciación y maduración de los condrocitos articulares, regulando la actividad de algunos de los principales componentes de la estructura del cartílago articular, como es el caso del gen SOX9 que regula la actividad del COL2A1 ¹⁴¹. Kan *et al.* relacionaron el gen SOX11 con la regulación del gen GDF5 a través de un sitio de unión específico de este último al que se une el SOX11. Estos autores también mostraron que los niveles de expresión del gen SOX11, que se expresa preferentemente en la zonas de cartílago sometidas a mayores cargas, se encuentran disminuidos, junto con los de GDF5, en el cartílago artrósico, relacionando sus niveles de expresión con la progresión de la enfermedad en la rodilla ¹⁴².

Por otra parte, el polimorfismo rs12982744 situado en el gen DOTL1 del cromosoma 7q22 se relacionó con una disminución en el riesgo de padecer artrosis de cadera debido a que el alelo G se asocia con un incremento en el espacio intra-articular en la cadera ^{143,144}.

Otro gen relacionado con la artrosis de rodilla y de cadera es el SMAD3, situado en el cromosoma 15 y que actúa como modulador transcripcional y transductor en la ruta del *TGF-β*. Más concretamente, el polimorfismo

rs12901499 presente en dicho gen se relacionó con la prevalencia de artrosis de rodilla y cadera en una población europea ¹⁴⁵.

Bijsterbosch et al. encontraron una asociación estadísticamente significativa entre el gen ASPN y la progresión de la artrosis de manos en un estudio de seguimiento de 6 años. Esta asociación tiene lugar entre los portadores del alelo C del polimorfismo rs13301537 del gen ASPN, los cuales presentan una mayor frecuencia en el grupo de progresión. Además la variación media de la reducción de espacio articular así como la presencia de osteofitos es mayor en los portadores del polimorfismo ¹⁴⁶ (Tabla 6).

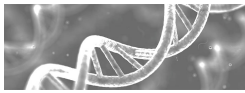
Tabla 6: Genes asociados con diferentes tipos de artrosis.

GEN	LOCALIZACIÓN	POBLACIÓN
GDF-5	Rodilla y cadera	Europea y asiática ^{137,139}
SOX11	Rodilla	Asiática ¹⁴²
DOTL1	Cadera	Europea ¹⁴³
SMAD3	Rodilla y cadera	Europea ¹⁴⁵
ASPN	Manos	Europea ¹⁴⁶
CALM1	Cadera	Asiática ¹⁴⁷
DIO2	Cadera	Europea y asiática ¹⁴⁸
DIO3	Rodilla y cadera	Europea ¹⁴⁹
SREBF2	Rodilla	Europea ¹⁵⁰

Estudios de asociación de genoma completo

En los últimos años la evolución tecnológica que se ha producido en las técnicas de secuenciación ha permitido que los estudios de asociación de genoma completo sean una herramienta más en la búsqueda de biomarcadores genéticos para la mayoría de patologías entre las que se encuentra la artrosis.

Hasta el año 2012, en los diferentes estudios de asociación de genoma completo realizados sobre la patología artrósica en la población europea sólo se habían detectado, con una significación estadística de 5×10^{-8} , tres loci asociados con la enfermedad. Además del gen GDF5, también se ha relacionado



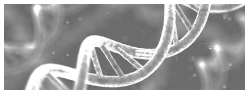
una región del cromosoma 7q22 y el gen MCF2L ¹⁵¹⁻¹⁵³. Sin embargo el trabajo realizado por miembros del consorcio arcOGEN ha permitido identificar nuevos posibles marcadores genéticos de artrosis situados en los cromosomas 3, 6, 9 y 12 y que corresponden con las posiciones de los genes GNL3, GLT8D1, ASTN2, FILIP1, SENP6, KLHDC5, PTHLH y CHST11 ^{154,155} (Tabla 7).

La comprensión de la contribución genética a la artrosis posee dos implicaciones clínicas importantes. Por un lado, permitirá entender la patogénesis molecular de la enfermedad abriendo nuevas vías para intervenciones terapéuticas y, por otro lado, permitirá detectar pacientes con alto riesgo de desarrollar la enfermedad y realizar un mejor seguimiento de los mismos durante el proceso de progresión de la enfermedad ¹⁵⁶.

Tabla 7: Genes asociados con diferentes tipos de artrosis en estudios de asociación de genoma completo.

GEN	LOCALIZACIÓN	POBLACIÓN
GDF-5	Rodilla	Europea y asiática
Locus 7q22	Rodilla	Europea
MCF2L	Rodilla y cadera	Europea
NCOA3	Cadera	Europea
HLA clase II/III	Rodilla	Asiática
DVWA	Rodilla	Asiática
DOTL1	Cadera	Europea
COG5	Rodilla	Europea
GPR22	Rodilla	Europea
DUS4L	Rodilla	Europea
HBP1	Rodilla	Europea
BTNL2	Rodilla	Europea y asiática
ALDH1A2	Mano	Europea
GNL3	Rodilla	Europea
GLT8D1	Rodilla	Europea
ASTN2	Cadera	Europea
FILIP1	Cadera	Europea
SENP6	Cadera	Europea
KLDHC5	Cadera	Europea
PTHLH	Cadera	Europea
CHST11	Rodilla	Europea

Referencias: Valdés et al. 2011, Rodríguez-Fontenla et al. 2015



Menopausia

La artrosis muestra una prevalencia mayor para el sexo femenino que se incrementa de forma notable cuando se alcanzan edades características del proceso menopáusicos. Durante la menopausia los niveles de estrógenos caen notablemente y entre las diversas funciones en las que intervienen estas hormonas se encuentra la regulación de la homeostasis ósea. Además también modulan la actividad del condrocito y la síntesis de MMPs, además de la producción de óxido nítrico y de especies reactivas de oxígeno (*ROS*, del inglés *Reactive Oxygen Species*) ^{116,157}.

En mujeres postmenopáusicas la terapia de reemplazo hormonal ejerce un efecto protector frente al desarrollo de la artrosis, si consideramos mujeres sometidas a tratamiento durante largos periodos de tiempo y las comparamos con mujeres que nunca han recibido tratamiento hormonal ¹¹⁷. En el mismo sentido se ha visto un efecto protector frente a la artrosis de rodilla en mujeres sometidas a terapia de reemplazo hormonal ¹⁵⁸. Sin embargo *de Klerk et al.* encuentran una relación contraria en el caso de la artrosis de cadera ¹⁵⁹. Sin embargo, la relación entre menopausia y artrosis no siempre muestra una asociación estadísticamente significativa. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por *Zhang et al.* no se detectó ninguna relación entre el uso de la terapia hormonal de reemplazo y la progresión radiológica de la artrosis de rodilla ¹⁶⁰.

Se puede observar por tanto que los estudios sobre la influencia de la terapia de reemplazo hormonal en el desarrollo de la artrosis en mujeres postmenopáusicas no son concluyentes en ningún sentido y es necesario seguir realizando estudios de asociación para conseguir relacionar el efecto de la terapia hormonal con la artrosis.

1.5.2 Factores modificables

Obesidad

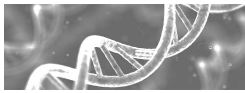
La obesidad es uno de los factores más relevantes en cuanto al riesgo y a la progresión de la artrosis. Parece evidente que mecánicamente una persona obesa tiene más probabilidades de padecer artrosis ya sea de rodilla y/o cadera. En este sentido muchos autores encuentran asociaciones significativas entre obesidad y artrosis de cadera ¹⁶¹. Sin embargo hay que tener en cuenta la forma de definir la artrosis puesto que esta asociación es menos consistente cuando hacemos una definición radiológica de la artrosis que cuando la definición de la misma se hace clínicamente ¹⁶².

Más allá del factor biomecánico, la obesidad posee un componente metabólico que interfiere en el desarrollo de la artrosis, ya que hay estudios que encuentran relaciones significativas entre la artrosis de manos y la presencia de obesidad, en donde el componente biomecánico no influye ¹⁶³. En este sentido se cree que algunas adipocinas pro-inflamatorias producidas por el tejido adiposo contribuyen al desarrollo y progresión de la artrosis ¹⁶⁴. Además, en la relación existente entre obesidad y artrosis se han encontrado como posibles biomarcadores la leptina, la resistina y la adiponectina cuyos niveles influyen sobre el metabolismo del cartílago ¹⁶⁵.

Ocupación laboral

Un factor a tener en cuenta en el desarrollo y progresión de la artrosis es el que hace referencia a la actividad laboral y su efecto sobre las articulaciones. Dentro de las causas que lo relacionan se encuentran: las fuerzas mecánicas, la postura adoptada y el uso repetitivo al que se ven sometidas las articulaciones.

Varios artículos revisados por *Lievensen et al.* y por *Jensen*, entre los que se incluyen el estudio de la cohorte de Framingham, encuentran una relación entre trabajadores sometidos a cargas pesadas en el desempeño de su actividad laboral con el desarrollo de artrosis de cadera ^{166,167}. En la misma línea *Palmer et al* describen la relación entre trabajos con cargas pesadas, que incluyan estar arrodillado o en cuclillas, así como aquellos que supongan subir



y bajar escaleras, con el desarrollo y la progresión en la artrosis de rodilla ¹⁶⁸. Otros trabajos refuerzan la relación entre actividad laboral y artrosis de rodilla ^{169,170}. Existen también estudios que establecen relaciones a nivel de otros factores de riesgo entre la artrosis de rodilla y la ocupación laboral como es el caso de la obesidad ¹⁷¹.

Considerando la posibilidad de incluir este factor como biomarcador de progresión en artrosis hay que tener en cuenta que todos los estudios realizados en relación con este factor se ciñen a estudios de tipo transversal. No existen trabajos longitudinales que relacionen la ocupación laboral con la progresión de la patología. Por lo que este factor no se puede considerar factor pronóstico al menos hasta que se realicen trabajos con un periodo de seguimiento en donde se estudie la progresión de la artrosis a través de parámetros clínicos o radiológicos.

1.6 LA MITOCONDRIA

1.6.1 Generalidades

Las mitocondrias son orgánulos celulares que se encuentran presentes en todas las células eucariotas y cuyo origen se sitúa hace aproximadamente 1,5 millones de años cuando se produjo la fusión entre una célula eucariótica y una protobacteria capaz de realizar la fosforilación oxidativa (*OXPHOS*, del inglés *Oxidative phosphorylation*) ¹⁷². Su principal función celular es la producción de energía a través del proceso de *OXPHOS*, aunque también desempeña otras funciones clave para la homeostasis celular como son por ejemplo la regulación de los procesos de apoptosis, de termogénesis y de concentración de calcio, la síntesis de esteroides y de hemoglobina entre otros procesos ¹⁷³. El número de mitocondrias varía en función del tejido y proporcionalmente a la demanda energética del mismo ¹⁷⁴. Así, las células de los mamíferos contienen en general varios cientos de mitocondrias pero este número se incrementa a más de 1000 en el caso de las células hepáticas (o si prefieres pon hepatocitos) mientras que las células musculares contienen un número mucho mayor ¹⁷⁵. Teniendo en cuenta la diferente distribución de

mitocondrias en función del tejido sus porcentajes en volumen pueden variar de un 20% del volumen total de la célula hasta un 40% cómo ocurre en el caso particular de las células cardíacas. Tienen forma de cilindro alargado y su diámetro varía entre $0,5\mu\text{m}$ y $1\mu\text{m}$ con una longitud de $10\mu\text{m}$ aproximadamente. Pueden observarse al microscopio aunque no sería hasta el siglo XIX cuando Kolliker las identificó por primera vez ¹⁷⁶.

Las mitocondrias están rodeadas por dos membranas de entre 5 y 7nm de grosor, la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI). Entre ambas membranas se encuentra el espacio inter-membrana y el interior de la mitocondria se denomina matriz mitocondrial (Figura 11). La composición de las dos membranas es diferente así como las funciones y actividades enzimáticas de cada una de ellas.

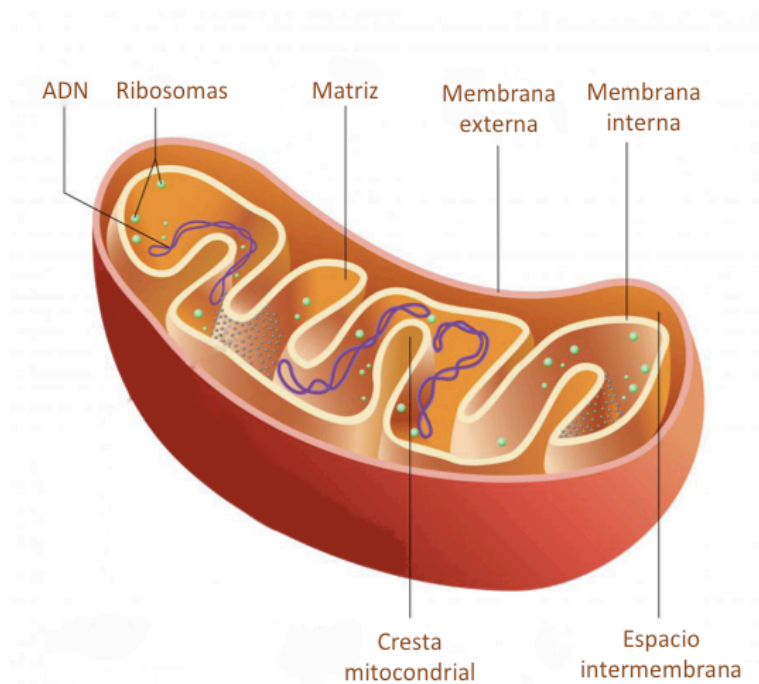
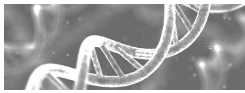


Figura 11: Estructura básica y componentes de una mitocondria

La MME es lisa y menos densa que la MMI, y altamente permeable para moléculas de hasta 10kDa gracias a los poros de 2nm de diámetro que forman las porinas mitocondriales de las que se compone ¹⁷⁷. Por su parte, la MMI está



compuesta por un 75% de proteínas y es prácticamente impermeable para la mayoría de sustancias. Permite el paso de moléculas neutras de un tamaño inferior a 150Da, así como el O_2 , CO_2 y H_2O , mientras que el paso de iones pequeños como H^+ , K^+ , Na^+ y Cl^- es controlado. La MMI forma una serie de pliegues que conforman las llamadas “crestas mitocondriales”, que es en donde se encuentran los complejos que forman la cadena de transporte electrónico (CTE) ¹⁷⁶.

En el espacio intermembrana se acumula una elevada concentración de protones, siendo una parte fundamental en el proceso de producción de adenosín trifosfato (*ATP*, del inglés *adenosine triphosphate*). En la matriz mitocondrial el agua representa en torno al 50% del espacio; además, dentro de la matriz existe una elevada concentración de enzimas relacionados con el metabolismo mitocondrial, así como enzimas que llevan a cabo las reacciones de la *OXPHOS*; por otra parte, en este espacio es donde se encuentran las copias de ADN mitocondrial (ADNmt), los ribosomas y demás componentes de la maquinaria de replicación y traducción del material genético mitocondrial^{174,176}.

Producción de *ATP*

La principal función de la mitocondria es la de proporcionar energía a la célula a través de la fosforilación oxidativa. El proceso global de producción de energía por parte de la célula se resume en tres etapas. La primera se corresponde con el metabolismo oxidativo de los sustratos primarios -glucosa, ácidos grasos y aminoácidos-, a través de la glucólisis, la β -oxidación de los ácidos grasos y la desaminación oxidativa respectivamente, dando lugar a moléculas de acetyl-CoA. En la segunda etapa tiene lugar la incorporación de los dos carbonos de cada acetyl-CoA al ciclo del ácido cítrico (o ciclo de Krebs) donde son oxidados a CO_2 , y la energía que estaba acumulada se libera en forma de guanósín trifosfato y poder reductor ($NADH$ y $FADH_2$) (Figura 12). Este poder reductor se emplea en la síntesis de *ATP* mediante un proceso denominado *OXPHOS*, el cual tiene lugar en las mitocondrias, y representa la tercera etapa del proceso global de producción de energía celular. El *ATP* producido a través de este proceso llega a representar hasta al 90% de la

energía celular obtenida. Sin embargo, en el cartílago articular, debido a la baja concentración de O_2 que esta presente en el mismo, y que disminuye progresivamente desde la capa superficial a la profunda hasta representar un valor aproximado de un 1%, el condrocito obtiene la mayoría de la energía necesaria a partir de la glucolisis, mientras que la fracción correspondiente a la *OXPHOS* representa un porcentaje de entre un 10 y un 25% ^{178,179}. Sin embargo cuando la energía obtenida de la glucolisis anaerobia no es suficiente, se incrementa el uso de la *OXPHOS* ¹⁷⁹.

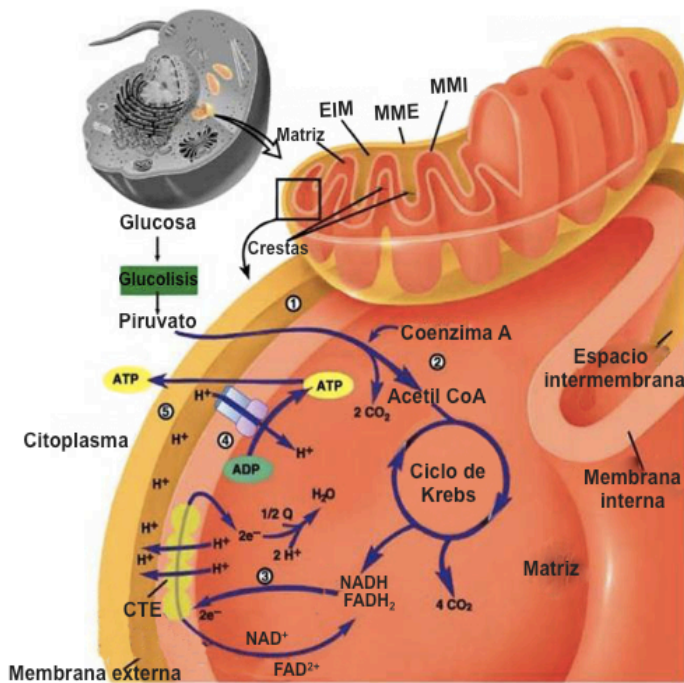
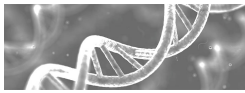


Figura 12: Producción de ATP mitocondrial. El piruvato obtenido en el proceso de glucolisis pasa a la matriz mitocondrial como Acetil CoA por acción de la piruvato deshidrogenasa (1). El Acetil Coa actúa como sustrato en el ciclo de Krebs (2) del que se obtienen las especies reductoras NADH y FADH₂ que ceden electrones a la CTE (3). La diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana interna es utilizada por la ATPasa (4) para generar ATP que es transportado al citoplasma celular (5). NADH: nicotinamida adenina dinucleótido; FADH₂: flavín adenín dinucleótido; CTE: cadena de transporte electrónico; EIM: espacio intermembrana; MMI: membrana mitocondrial interna; MME: membrana mitocondrial externa; ADP: adenosín difosfato; ATP: adenosín trifosfato.



El proceso *OXPHOS* produce la reducción O_2 para formar H_2O utilizando para ello los electrones cedidos por el NADH y el $FADH_2$. La circulación de los electrones a través de los complejos que forman la cadena de transporte electrónico, situados en la membrana mitocondrial interna, provoca un bombeo de protones al espacio inter-membrana, provocando una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la MMI que conlleva un gradiente electroquímico que crea una fuerza protón-motriz que impulsa la síntesis de *ATP* a medida que los protones fluyen de manera pasiva a la matriz mitocondrial a través de la *ATP*-sintasa. Este proceso de obtención de energía a partir de una fuerza protón-motriz se denomina modelo quimiosmótico y fue propuesto por Mitchell ¹⁸⁰. La producción de *ATP* a través de la fosforilación oxidativa es un proceso mucho más eficiente que la glucólisis anaerobia, ya que se obtienen hasta 36 moléculas de *ATP* por las 2 que se obtienen a través de la glucólisis anaerobia ¹⁸¹.

El sistema *OXPHOS* está compuesto por el acoplamiento de cinco complejos de proteínas. En los complejos I y II se produce la oxidación del NADH y del $FADH_2$ respectivamente liberándose dos electrones que son transportados al complejo III por el coenzima Q_{10} para pasar después al complejo IV por el citocromo C. El aceptor final de los electrones es el oxígeno el cual, una vez reducido, da lugar a la formación de agua. Durante el mismo proceso de movimiento de electrones los complejos I, III y IV liberan protones (H^+) al espacio intermembrana creándose un gradiente de protones a través de la membrana interna, creando una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana interna que es utilizado por el complejo V para generar *ATP*, que es transportado a la matriz mitocondrial (Figura 13).

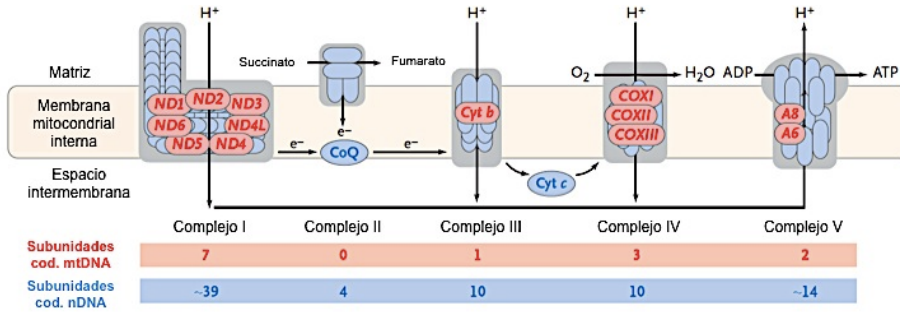
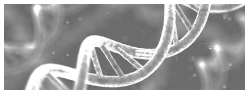


Figura 13: Representación de la cadena de transporte electrónico. Durante el proceso de fosforilación oxidativa el movimiento de los electrones a través de los complejos que forman la cadena de transporte electrónico genera un flujo de protones hacia la matriz mitocondrial que crea una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana mitocondrial interna que es aprovechado por el complejo V para generar *ATP*. Imagen adaptada de *Dimauro et al. 2003*.

Además de la producción de *ATP*, los gradientes de potencial y de protones regulan otras funciones como el transporte iónico, el intercambio de metabolitos, la entrada de proteínas o la fusión mitocondrial. Por eso cualquier defecto en el proceso de *OXPHOS* puede causar numerosos fallos a nivel celular. La regulación del proceso de *OXPHOS* se lleva a cabo tanto por el ADN nuclear como por el mitocondrial, en este sentido el genoma nuclear tiene una gran importancia puesto que codifica un gran número de las subunidades que forman los diferentes complejos ¹⁸²⁻¹⁸⁵. El proceso de *OXPHOS* es además una de las principales fuentes de generación de especies reactivas de oxígeno. Se estima que alrededor de un 3% del oxígeno molecular (O_2) consumido durante el proceso de *OXPHOS* sufre una reducción incompleta dando lugar a la especie reactiva anión superóxido (O_2^-) en lugar de agua ¹⁸⁶. Este anión se crea a partir del exceso de electrones presentes en los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico de modo que son transferidos directamente al O_2 generando dicho anión ¹⁸⁷. El O_2^- es convertido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción del enzima manganeso superóxido dismutasa (SOD2) en la matriz o por el enzima cobre/zinc superóxido dismutasa (SOD1) en el espacio intermembrana o el citosol. El H_2O_2 es detoxificado en agua bien a través de la acción del enzima glutatión peroxidasa en la mitocondria o el citosol o bien mediante el enzima catalasa en los peroxisomas. Sin embargo, en presencia de metales de transición en forma reducida, como el Fe^{2+} , el H_2O_2 se convierte en el



anión hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) que es la especie reactiva de oxígeno más altamente reactiva ¹⁸⁸. Las especies reactivas de oxígeno junto con las especies reactivas de nitrógeno (óxido nítrico, anión peroxinitrito etc) están implicadas en procesos de apoptosis celular, daños sobre el ADN y las membranas celulares etc siendo relacionados con los procesos de envejecimiento ¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

Por todo lo expuesto anteriormente y a pesar de no ser el principal proceso de generación de energía en el condrocito, el proceso de *OXPHOS* y la implicación de la mitocondria en la patología presentan un gran interés y una gran importancia en la patología y el desarrollo de la misma.

1.6.2 Genoma mitocondrial

La mitocondria posee su propio material genético, el ADN mitocondrial (ADNmt), que se hereda exclusivamente por la vía materna. El ADNmt es una molécula circular de doble cadena de 16569 pares de bases (pb) ¹⁹², que codifica para 13 polipéptidos pertenecientes a las subunidades de los complejos que conforman la cadena de transporte electrónico (CTE), 22 ácidos ribonucleicos de transferencia (ARNt) y 2 ARN ribosómicos (ARNr), el 12S y el 16S ¹⁹³. Las dos cadenas de las que está compuesta cada molécula del ADNmt poseen una composición muy diferente en cuanto a la proporción de citosinas y guaninas, de modo que la hebra que presenta una mayor proporción de bases púricas (guanina y adenina) se denomina cadena pesada o H (del inglés *heavy*) mientras que la otra cadena, rica en bases pirimidínicas (citosina y timina), se denomina cadena ligera o L (del inglés *light*). De los 37 genes que codifica el ADNmt, la cadena pesada codifica 28 mientras que la cadena ligera codifica 9 de los cuales 8 corresponden a ARNt. Por convenio la cadena que se toma como referencia para la numeración de las 16569 bases es la cadena ligera.

Los componentes de la cadena de transporte electrónico son codificados en su mayoría por el genoma nuclear a excepción de los ya citados 13 polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial y que se describen a continuación:

- Complejo I (NADH deshidrogenasa): ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6.
- Complejo III (citocromo b óxido-reductasa): Cyt b.
- Complejo IV (citocromo c-oxidasa): COI, COII, COIII.
- Complejo V (ATP sintetasa): ATPasa 6 y ATPasa 8.

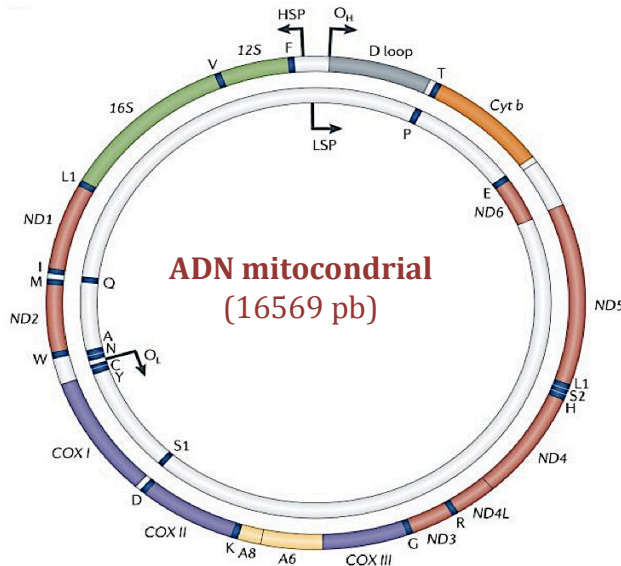
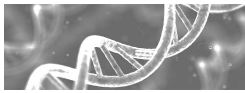


Figura 14: ADN mitocondrial. El ADNmt codifica para 37 genes, 22 ARNt (representados por una sola letra correspondiente a cada aminoácido), 2 ARNr (16S y 12S) y 13 ARNm que se corresponden con subunidades de los componentes de la cadena de transporte electrónico: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6 codifican para componentes del complejo I (NADH deshidrogenasa); cyt b codifica para una subunidad del complejo III (citocromo b óxido-reductasa); COX I, COX II y COX III codifican para subunidades del complejo IV (citocromo c-oxidasa); A6 y A8 codifican para el complejo V (ATP sintetasa). O_H y O_L orígenes de replicación de las cadenas pesada y ligera, respectivamente. HSP y LSP promotores de transcripción de la cadena pesada y ligera, respectivamente. Adaptada de *Schon et al. 2012*.

A diferencia del genoma nuclear, el ADNmt presenta una única región no codificante, la región *D-loop* (del inglés *displacement-loop*) o *región control*. Este segmento del ADNmt consta de 1124 pb y abarca desde la posición 16024 hasta la 576. La región *D-loop* es la responsable de regular la replicación y la transcripción del ADNmt ya que en ella se encuentran el origen de replicación de la cadena pesada (cadena H), además de las regiones promotoras de la



transcripción de ambas hebras y otros factores implicados en dichos procesos. Esta zona presenta una elevada tasa de mutación del orden de 10 veces mayor que el resto del genoma mitocondrial ^{194,195}.

Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de ADNmt dependiendo de la célula a la que pertenezcan y de las necesidades energéticas del tejido al que pertenezca, esta proporción hace que el número de copias de ADNmt por célula varíe entre 1000 y 10000 dependiendo del tejido y pasando de unos cientos en los espermatozoides al extremo opuesto en los oocitos en donde el número puede alcanzar las 100000 copias ¹⁹⁶.

La ausencia de histonas que lo protejan, además de la baja fidelidad en la replicación y unos mecanismos de reparación menos eficientes que los del ADN nuclear, provocan que el ADNmt presente una tasa de mutación entre 5 y 10 veces mayor que el ADN nuclear ¹⁹⁷. Además presenta una mayor exposición a los daños provocados por las especies reactivas, debido a su proximidad a la fuente de generación de radicales libres, formados a partir del metabolismo oxidativo. Como subproductos de las reacciones llevadas a cabo para generar el *ATP* se producen *ROS*, y especies reactivas de nitrógeno fundamentalmente. Todas ellas poseen un alto poder oxidante, pudiendo dañar a la propia mitocondria a través de diferentes mecanismos, entre los que se encuentran los daños sobre el ADNmt, alterando la funcionalidad del orgánulo y provocando como resultado final la apoptosis celular. A su vez, las diferentes variantes y alteraciones presentes en el ADNmt pueden provocar una mayor o menor eficiencia energética, alterando la producción de las *ROS* e influyendo sobre los propios mecanismos de apoptosis de la mitocondria.

En relación con la genética mitocondrial cabe destacar que en los últimos años diferentes estudios han puesto de manifiesto el papel del ADNmt en la patología artrósica. La influencia del factor genético mitocondrial en la artrosis se desarrolla de forma más extensa en un apartado posterior de esta tesis.

1.6.3 Enfermedades mitocondriales

El estudio de las enfermedades asociadas a la mitocondria desde un punto de vista molecular comienza en el año 1988 cuando se describen mutaciones patogénicas en el ADNmt relacionadas con diferentes miopatías¹⁹⁸, como la neuropatía óptica hereditaria de Leber, cuyas mutaciones primarias se encuentran en las posiciones G1178A , G3460A y T14484C ¹⁹⁹. Previamente, en el año 1962 Luft asoció un trastorno metabólico con una disfunción mitocondrial ²⁰⁰ abriendo un nuevo campo de investigación alrededor de la mitocondria. La primera clasificación de estas patologías, hecha desde un punto de vista bioquímico, fue desarrollada en el año 1987 por Dimauro ²⁰¹.

En la actualidad existe una extensa lista de patologías mitocondriales relacionadas con alteraciones en el propio ADNmt, ya sean deleciones, inserciones, o sustituciones ¹⁸⁵ (Figura 15). En el caso de los polimorfismos de base sencilla o de una sola base también se conocen como *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*. En general afectan a órganos o funciones con una elevada demanda energética como pueden ser las patologías asociadas con el corazón o el cerebro ²⁰². Las patologías mitocondriales presentan un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde problemas oculares a motores pasando por episodios de demencia, entre otras ²⁰³. Los trastornos causados por estas patologías también se han relacionado con algunos parámetros bioquímicos como pueden ser el incremento en la cantidad de algunas proteínas o la alteración de la concentración de algunos componentes de la sangre ²⁰⁴⁻²⁰⁶.

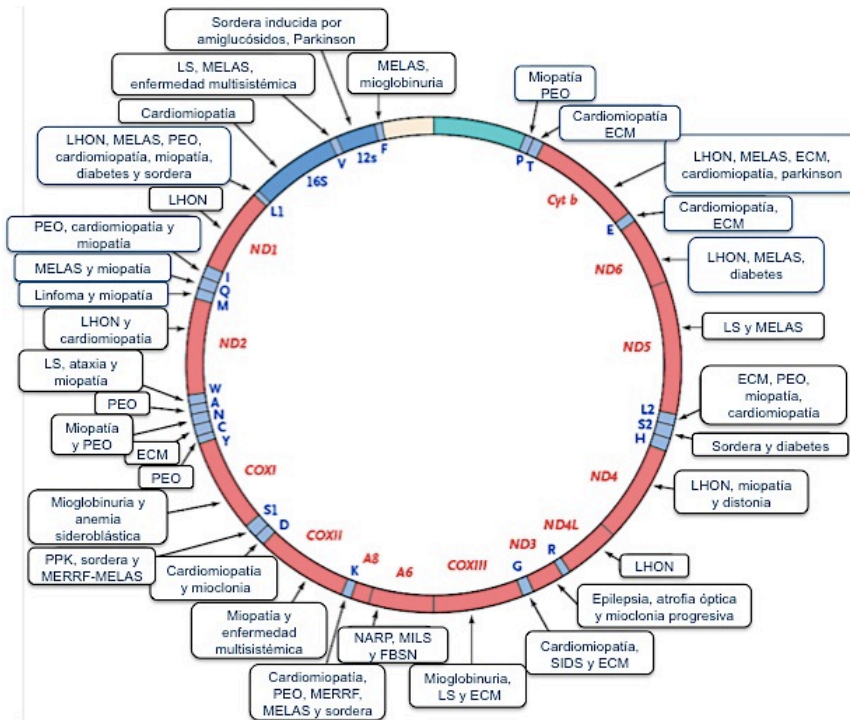
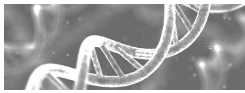


Figura 15: Enfermedades causadas por mutaciones en el ADNmt. ECM: encefalomiopatía; FBSN: necrosis estriatal bilateral familiar; LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber; LS: síndrome de Leigh; MELAS: encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios de infarto cerebral; MERRF: síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas; MILS: síndrome de Leigh por transmisión materna; NARP: neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa; PEO: Oftalmoplejía externa progresiva; PPK: queratodermia palmoplantar; SIDS: síndrome de muerte infantil súbita. Figura adaptada de DiMauro et al. 2003.

Algunas mutaciones en el ADNmt se han relacionado con diferentes patologías hereditarias ²⁰⁷, si bien no siempre las patologías mitocondriales resultan hereditarias ya que pueden generarse por mutaciones somáticas ²⁰⁸, incrementándose la probabilidad de sufrir alguna de ellas con la edad ^{209,210}. Además, las manifestaciones fenotípicas provocadas por las mutaciones somáticas del ADNmt no se producen hasta alcanzar un valor crítico o umbral en el porcentaje de mitocondrias que la portan dentro de las células, variando estos porcentajes desde un 50-60% para deleciones a un 90% o incluso mayor para algunas mutaciones puntuales ²¹¹.

Se conoce desde hace tiempo la relación entre diversas enfermedades neurodegenerativas y las alteraciones mitocondriales. Entre las

encefalomiopatías destacan cuatro síndromes por su prevalencia: la acidosis láctica y episodios de accidente cerebrovascular (*MELAS*), el síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas (*MERRF*), la neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (*NARP*), su variante el síndrome de Leigh de herencia materna (*MILS*), además de la ya citada neuropatía óptica hereditaria de Leber ^{183,212}. Otro ejemplo es la enfermedad de Parkinson, en la que se ha establecido que determinadas alteraciones en las funciones mitocondriales (bioenergética, transporte y biogénesis entre otras) están implicadas en el desarrollo de la enfermedad ^{213,214}.

Existe también un amplio abanico de cardiopatías relacionadas con alteraciones en el ADNmt ²¹⁵. Así se ha relacionado la presencia de la mutación en la posición A3243G con una mayor prevalencia en la hipertrofia ventricular izquierda ²¹⁶ aunque las manifestaciones clínicas más comunes de esta mutación son la diabetes y la sordera hereditarias ²¹⁷ así como el *MELAS* ²¹⁸. En relación con la hipertrofia ventricular, también han sido descritas otras mutaciones que afectan, entre otros, a genes de ARNt ^{219,220}.

Las mutaciones en el ADNmt pueden ser una de las causas en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer como pueden ser el cáncer colorectal, el hepático, la leucemia, el cáncer de mama o el esofágico ²⁰². El ADNmt constituye además una posible diana terapéutica en la búsqueda de nuevos fármacos y vías de tratamiento contra el cáncer ²²¹.

Debido a la relevancia e influencia del ADNmt en una amplia variedad de patologías se han creado bases de datos que recogen las mutaciones del ADNmt potencialmente patogénicas como son *MITOMAP*; *A human mitochondrial genome database*, *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)* y *Human Mitochondrial Database (HmtDB)* ²²²⁻²²⁵. En la tabla 8 se recogen algunas patologías mitocondriales, las posiciones del ADNmt afectadas y sus manifestaciones clínico-biológicas.

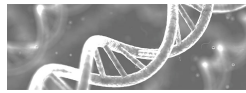
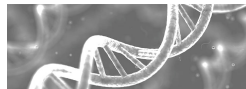


Tabla 8: Enfermedades para las que se ha encontrado asociación con mutaciones en el genoma mitocondrial.

ENFERMEDAD	POLIMORFISMO	MANIFESTACIONES CLÍNICAS
Miopatía mitocondrial y cardiopatía	A3260G, C3303T	Hipertrofia del músculo cardíaco, obstrucción del flujo sanguíneo y deterioro de la función del miocardio.
Miocardopatía heredable por vía materna	A4300G, G12192A	Hipertrofia del músculo cardíaco y obstrucción del flujo sanguíneo.
Miocardopatía hipertrófica heredable por vía materna	A4295G, T9997C	Hipertrofia del músculo cardíaco y obstrucción del flujo sanguíneo.
Miocardopatía	A8348G	Deterioro de la función del miocardio
Miocardopatía dilatada	T12297C	Agradamiento del corazón y pérdida de la capacidad contráctil.
Sordera	A636G, A827G, T961C, T1005C, A1116G, C1494T	Perdida auditiva.
Sordera y miopatía	G5783A	Perdida auditiva y trastornos musculares.
Alzheimer y Parkinson	A3397G, G5460A, G5460T, G5783A	Deterioro cognitivo, trastornos conductuales y de movimiento.
Demencia y corea	G5549A	Perdida progresiva de las funciones cognitivas. Movimientos involuntarios de pies y manos
Miopatía mitocondrial	T582C, T618C, G3242A, A3251G, C3254G, A4267G, T4409C, G4450A, G5521A, T5543C, T7480G, G7497A, A7526G, G10406A, T8355C, T8362G, T15940delT, C15990T	Disminución de las capacidades de nervios y músculos, debilidad y movimiento descoordinado.
Oftalmoplejía externa progresiva crónica y miopatía mitocondrial	C3254T, T4274C, T4285C, G4298A, G4309A, T5628C, T5692C, G5698A, G5703G, G8342A, G12294A, T12311C, G12315A	Parálisis progresivo de músculos extraoculares. Disminución de las capacidades de nervios y músculos, debilidad y movimiento descoordinado.
Síndrome de Kearns-Sayre	G3249A, G3255A	Debilidad o parálisis de los músculos oculares, anomalías de las señales eléctricas que controlan el latido del corazón, problemas de coordinación motora, altos niveles de proteínas en el líquido cefalorraquídeo.
MELAS (encefalomiopatía	A3243G, G3244A, A3252G, G3256T,	Migraña, vómitos, demencia, epilepsia, sordera, ataxia, retinosis

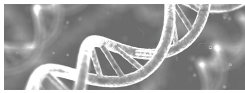
mitocondrial, acidosis láctica y episodios de accidente cerebrovascular)	T3258C, T3271C, T3291C, G1642A, G583A, C3093G, G12147A.	pigmentaria, cardiomiopatía, disfunción tubular renal proximal, miopatía, intolerancia al ejercicio y debilidad en las extremidades proximales. Pérdida gradual de las capacidades motoras, mentales y visuales.
MERRF (síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas)	G611A, A8344G, T8356C, G8361A, G8363A, G3255A, G12147A	Acidosis láctica, aumento de lactato en el líquido cefalorraquídeo, epilepsia mioclónica progresiva, degeneración neuronal progresiva, atrofia cerebral, demencia, pérdida de audición neurosensorial.
MILS (síndrome de Leigh de herencia materna)	A5537insT	Encefalopatía, acidosis láctica, convulsiones, miocardiopatía, trastornos respiratorios y retraso en el desarrollo.
Neuropatía óptica hereditaria de Leber	G11778A* , G3460A* , T14484C* , G3635A, G3700A, G3733A, C4171A, T10663C, G14459A, C14482A, C14482G, A14495G, T14502C, 14568T.	Pérdida visual, bilateral y simétrica, atrofia óptica severa y disminución permanente de la agudeza visual.
NARP (Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa)	T8993C, T8993G	Enfermedad nerviosa que afecta a los nervios fuera del sistema nervioso central (neuropatía periférica), un deterioro capacidad de coordinar los movimientos voluntarios (ataxia), una condición del ojo conocida como retinitis pigmentosa y otras anomalías adicionales.
Síndrome de Leigh	T14487C, G14459A, T10158C, T10191C, C11777A, T12706C, T9176C, T9176G, T9185C, T9191C, T8993C, C9537insC	Lesiones focales bilaterales en una o más áreas del sistema nervioso central, incluyendo el tronco del encéfalo, el tálamo, ganglios basales, cerebelo y médula espinal.
Leucemia	C1721T, T3394C, T4216C, A5843G, A8617G, C12196T, G13708A, T152C, G16390A, C16292T, G15761A, C16365T, T489C,	Aumento descontrolado de leucocitos en la médula ósea.
Cáncer de ovarios	A73G, T489C, A3434G, A3480G, T6124C, C6924T	Tumorogénesis de los tejidos.
Cáncer de próstata		Dolor, micción dificultosa, disfunción eréctil y tumorogénesis.



Cáncer de vejiga	T466C, C386A, T2445C, G3054A, T10071C, T10321C, A19792G, A10978G, A11065G, G11518A, C12049T, T16189TT, A16265C, A16532T	Hematuria, aumento de la frecuencia miccional y tumorogénesis en los demás tejidos y órganos.
Cáncer de mama	T152C, G3918A, G11900A, T12344A, C15535G, A15536G, T15541C, A15548G, C15556G, A15564G, C15574T, C15577A, A15581G, T15588G, T15601A	Tumorogénesis del tejido mamario y de los demás órganos.
Cáncer colorrectal	T710C, T1738C, T1967C, T2299A, T3308C, G6264A, G8009A, G9949A, T10563C, G14985A, T15572C	Hemorragia rectal, dolor abdominal y tumorogénesis.
Cáncer de pulmón	T2664C, C2998CT, G12345A, C16187T, A16183C, G5521A, G12300A	Tos, disnea, dolor torácico, cansancio, pérdida de peso, mareos y tumorogénesis en otros tejidos.
* Estas mutaciones representan por sí solas el 95% de los casos de la enfermedad de Leber siendo las principales para dicha enfermedad. Datos obtenidos de la base de <i>MITOMAP</i> .		

1.7 MITOCONDRIA Y ARTROSIS

La importancia de la mitocondria se ha visto incrementada en las últimas décadas a medida que el origen de diferentes enfermedades se ha relacionado con alteraciones en las proteínas mitocondriales y el ADNmt. Estas alteraciones de las proteínas mitocondriales provocan disfunciones importantes en el correcto funcionamiento a nivel celular originando numerosas patologías como las que hemos visto en el apartado anterior. Además hay que tener en cuenta que el desarrollo y el avance de las metodologías y técnicas de detección de estas alteraciones mitocondriales ha evolucionado notablemente en los últimos años; entre estos avances se encuentran las técnicas de secuenciación de genoma completo, por lo que se ha producido una importante mejora en la determinación y origen de algunas patologías mitocondriales ²⁰⁵. Debido a que el condrocito se encuentra en un tejido avascular y en un ambiente anaerobio, la principal fuente de obtención de energía es la glucólisis anaerobia y por tanto el papel de la mitocondria ha sido poco estudiado hasta hace relativamente poco tiempo ¹⁸⁶; sin embargo la fosforilación oxidativa supone alrededor del 25% del *ATP* generado en el condrocito ¹⁷⁹. La ausencia de tejido vascular convierte al líquido sinovial, además del hueso subchondral, en la principal fuente de nutrientes para el condrocito. El mecanismo por el que los nutrientes pasan del líquido sinovial a los condrocitos es un proceso de difusión de los mismos a través de la matriz del cartílago ²²⁶. El líquido sinovial proporciona además el oxígeno molecular necesario para llevar a cabo la fosforilación oxidativa. En este sentido la difusión del oxígeno a través de la matriz del cartílago crea un gradiente de concentración de oxígeno pasando de un 7% en la zona superficial del cartílago a menos de un 1% en la zona profunda ²²⁷, produciendo a su vez una modulación diferencial del proteoma entre pacientes artrósicos y controles sanos ²²⁸. Es por tanto en estas condiciones de hipoxia y de disponibilidad desigual de glucosa entre las zonas superficial y profunda del cartílago lo que hace que la mitocondria cobre mayor relevancia si cabe.



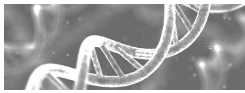
Como ya se citó anteriormente, la mitocondria se ha relacionado también con el proceso de apoptosis o muerte celular, actuando a su vez como una de las principales fuentes de generación de *ROS* ²²⁹. La acción de *ROS* sobre el ADNmt provoca un daño en su estructura, generando mutaciones que afectan a las diferentes subunidades que componen la cadena de transporte electrónico, lo que conlleva una disfunción en la respiración mitocondrial y un aumento en la producción de *ROS*, dando lugar a un proceso de retroalimentación entre el daño en el ADNmt y la generación de *ROS* que se conoce como círculo vicioso de daño sobre el ADNmt mediado por *ROS* ¹⁸⁸. Se ha demostrado que la acción de *ROS* mitocondrial provoca una destrucción de la matriz del cartílago a través de un aumento en la generación de metaloproteasas ²³⁰. De este modo la integridad mitocondrial es esencial en el mantenimiento de la matriz extracelular de cartílago ¹⁸⁶. Una de las principales causas de daño sobre el ADNmt es la producción de *ROS* de origen mitocondrial constituyen ¹⁸⁸; este daño a nivel del ADNmt se ha relacionado con el proceso artrósico ya que los pacientes artrósicos presentan mayores niveles de daño en el ADNmt que los pacientes sanos ²³¹. Este daño puede verse incrementado debido a que los niveles de antioxidantes, como la glutatión peroxidasa, el ácido ascórbico, la vitamina E y la catalasa, presentan valores inferiores a los de los controles sanos ²³². En el caso de la SOD2, que favorece la dismutación del anión superóxido hacia peróxido de hidrógeno y finalmente a oxígeno molecular, se ha encontrado la misma relación a nivel de proteína mitocondrial, presentando los pacientes artrósicos una disminución en los niveles de enzima antioxidante en comparación con los controles sanos ²³³. En un trabajo de *Fernandez-Moreno et al.* se observa por el contrario unos elevados niveles de SOD2 en los pacientes artrósicos frente a los controles sanos. Estas diferencias en los niveles de SOD2 se deben a que en los pacientes artrósicos existe un elevado estrés oxidativo relacionado con el propio proceso artrósico y que provoca un incremento de la actividad antioxidante a través de la SOD2. Además en este trabajo también se muestra una relación entre los niveles de SOD2 y el incremento en el grado *KL* de modo que los pacientes con mayor grado *KL* presentan a su vez unos mayores de SOD2 ²³⁴. Además las disfunciones

mitocondriales que causan una elevada producción de anión superóxido provocan una alteración en la concentración de Ca^{+2} en el condrocito y como resultado final se produce la generación de más *ROS* retroalimentando los procesos de degradación del cartílago ¹⁸⁶.

El óxido nítrico generado en el condrocito como consecuencia de la sobre-expresión de la óxido sintasa inducible, presente en el mismo y que es provocada por la presencia de citoquinas proinflamatorias, es un importante mediador del daño a nivel mitocondrial y de la apoptosis de los condrocitos, aunque el mecanismo exacto por el que se regula esta muerte celular sigue siendo desconocido ²³⁵. Uno de los mecanismos propuestos es la intervención sobre la actividad del complejo IV y la disminución del potencial de membrana necesario para un correcto funcionamiento del proceso de *OXPHOS* ²³⁶. Su influencia sobre la mitocondria va más allá de este efecto ya que induce la generación de *ROS* y daños sobre el ADNmt que como ya se citó son procesos que intervienen en la muerte celular del condrocito y en el mecanismo de apoptosis convirtiendo a la mitocondria en la principal vía de muerte celular en el caso de los condrocitos ²³⁷.

Además se ha descrito que los condrocitos artrósicos presentan una menor actividad que los condrocitos de personas sanas a nivel de los complejos mitocondriales II y III. Esta deficiencia en la actividad puede ser la causante de que los condrocitos artrósicos presenten también una mayor masa mitocondrial que los condrocitos sanos y que la célula intente compensar la menor actividad de estos complejos con un mayor número de mitocondrias ²³⁶. Se ha demostrado también que la inhibición de los complejos III y V provoca un aumento de los procesos inflamatorios, induce la síntesis de MMP, así como de proteínas proinflamatorias, y una inhibición en la síntesis de proteoglicanos ^{238,239}.

Con todos estos antecedentes y hallazgos sobre la influencia de la mitocondria en el proceso artrósico esta debe ser tomada en cuenta desde el punto de vista terapéutico ya que un control efectivo de los procesos mitocondriales puede ser una alternativa terapéutica para los pacientes con artrosis ²⁴⁰. En este sentido existen algunos tratamientos farmacológicos que



representan una alternativa de cara al futuro en la regulación de las funciones mitocondriales, punto clave para revertir el proceso apoptótico ²³⁷. En algunos modelos animales e in vitro esto se consigue a través de la inhibición de la caspasa 9, que juega un papel fundamental en dicho proceso de muerte celular, mediante el uso de inhibidores sintéticos se obtiene una reducción de hasta el 40% en la tasa de apoptosis ^{241,242}.

1.8 HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES

1.8.1 Origen de los haplogrupos mitocondriales

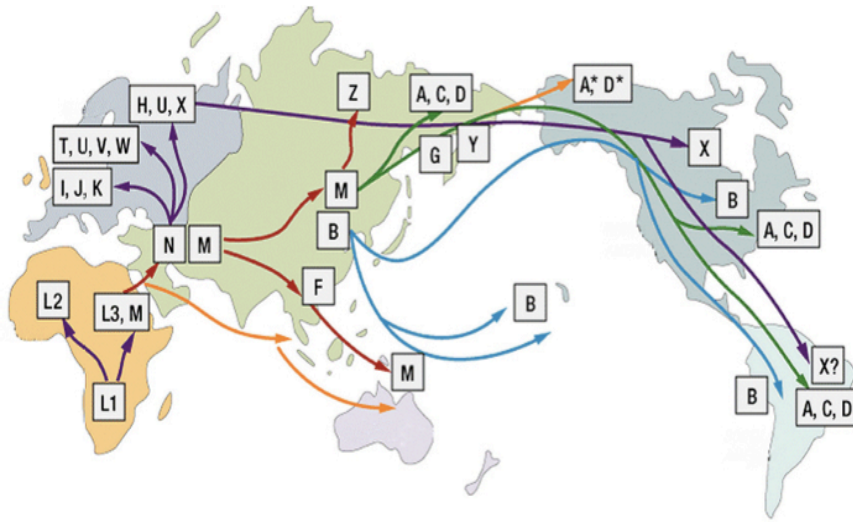
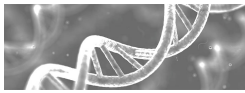
La alta tasa de mutación del ADNmt así como la elevada influencia de la deriva genética en el mismo, provoca que algunas de esas mutaciones permanezcan estables y se hereden de generación en generación ²⁴³. Esto ha permitido reconstruir la historia evolutiva de las poblaciones humanas y sus movimientos migratorios ²⁴⁴, los cuales son una de las causas de la variabilidad mitocondrial, a través de la selección natural de las mutaciones que confieren una ventaja evolutiva en la adaptación a las nuevas condiciones geográficas y ambientales ^{245,246}.

Las diferentes mutaciones adquiridas y estables en el tiempo permiten subdividir a las poblaciones en una serie de agrupaciones con características genéticas comunes. Existen diferentes tipos de mutaciones que pueden tener lugar en el ADNmt como deleciones, inserciones o sustituciones, ya sea en homoplasmia (el genoma mitocondrial es el mismo para todas las mitocondrias de un individuo) o en heteroplasmia (un mismo individuo presenta dos poblaciones mitocondriales con diferentes genomas).

El conjunto de SNPs del ADNmt que caracterizan a una población y que se diferencia de otras poblaciones conforma los denominados *haplogrupos mitocondriales*. Debido a que el ADNmt no sigue una herencia mendeliana, si no que se hereda sólo por vía materna, nos permite remontarnos a un origen común para todos los haplogrupos, la “Eva mitocondrial”, que constituye el antepasado matrilineal común más reciente de los seres humanos ²⁴⁷. Se estima que esta mujer vivió en África hace 200.000 años y a partir de sus

descendientes y a través de las migraciones del ser humano poblando el resto de los territorios continentales se han ido generando las mutaciones que, una vez fijadas, han dado lugar a los diferentes haplogrupos. Debido a que el proceso de generación de las mutaciones es rápido y a que tuvo lugar durante el período de dispersión de la raza humana, los haplogrupos presentan una tendencia a estar asociados geográficamente con una región o zona en particular. Así, al representar la distribución de los haplogrupos a nivel mundial nos encontramos con que las principales ramas del árbol filogenético poseen una asociación con los diferentes continentes (Figura 16). Se pueden distinguir tres ramas principales: una correspondiente al África subsahariana, otra del este de Asia y otra de la población de origen Europeo o Caucásico.

Los haplogrupos africanos se distribuyen en siete familias (L0, L1, L2, L3, L4, L5, L6) y hace 85.000 años, coincidiendo probablemente con cambios climáticos provocados por el último período glacial, la familia L3 se subdividió, dando lugar al resto de haplogrupos que existen en la actualidad, correspondientes a poblaciones no africanas. A partir del haplogrupo L3 se generaron tres grandes subgrupos: M, N y R. Hace 60.000 años estos tres subgrupos dieron lugar a los principales haplogrupos asiáticos que a su vez generaron los subtipos que poblaron América. Los haplogrupos europeos aparecieron alrededor de hace 45.000 años a partir de las ramas de los subgrupos N y R ²⁴⁸. En la actualidad los principales haplogrupos europeos son: H, HV, U, T, J, W, X, I. A su vez se distinguen múltiples subhaplogrupos dentro de cada uno. Aunque como ya se ha citado anteriormente, los haplogrupos que poseen un mismo origen filogenético se pueden agrupar en clústeres, es decir, haplogrupos que comparten un mismo origen filogenético y que a la vez poseen mutaciones hereditarias que les otorgan unas características diferenciadoras.



1.8.2

Figura 16: Mapa de la distribución de los haplogrupos mitocondriales. Desde el origen africano de la “Eva mitocondrial” hace aproximadamente 200.000 años y a través de las migraciones humanas las mutaciones se han ido acumulando en el ADNmt asociándose estas mutaciones a un área geográfica y dando lugar a los diferentes haplogrupos que existen en la actualidad. Imagen adaptada de *Family tree DNA*.

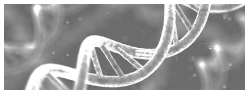
Haplogrupos y patologías

Aunque los polimorfismos que definen los diferentes haplogrupos no corresponden a mutaciones patológicas en sí, confieren unas características metabólicas particulares para cada uno de ellos pudiendo estas diferencias incrementar o disminuir la posibilidad de desarrollar una dolencia ²⁰⁷. En la tabla 9 se resumen algunas de las enfermedades en las que se ha encontrado una relación con los haplogrupos mitocondriales incrementándose o disminuyendo la prevalencia en la misma en función del haplogrupo portado o presentado mayor riesgo o tasa de progresión en alguna de estas dolencias en función también del haplogrupo.

Una de las teorías propuestas para explicar el origen de los diferentes haplogrupos mitocondriales así como sus diferentes características moleculares y metabólicas es la postulada por *Mishmar y Wallace* según la cual el origen de los haplogrupos mitocondriales sería la adaptación a los nuevos entornos geográficos y climáticos en los que se fue asentando el hombre a lo

largo de las diferentes migraciones que tuvieron lugar durante su expansión por toda la Tierra desde su origen africano. A medida que las condiciones climáticas y de entorno cambiaban, las mutaciones en el ADNmt más beneficiosas para la supervivencia se fueron implantando en la población originando los haplogrupos. Un ejemplo de esta adaptación climática se da en el haplogrupo J cuyos *SNPs* característicos provocan un desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico de manera que se genera menos *ATP* a cambio de producir más energía en forma de calor ²⁴⁹. Esto conlleva a su vez una menor producción de *ROS* lo que acarrea un efecto protector hacia padecer enfermedades asociadas con un elevado estrés oxidativo. En diferentes estudios llevados a cabo en población europea se ha constatado que los portadores del haplogrupo J presentan una longevidad mayor al resto de la población ²⁵⁰⁻²⁵³ y un menor riesgo de padecer Parkinson ²⁵⁴. Mediante el uso de híbridos transmitocondriales (células que poseen el mismo genoma nuclear y que solo se diferencian en el genoma mitocondrial) *Gómez-Durán et al.* encontraron diferencias en los niveles de ADNmt y ARNmt, la síntesis de proteínas mitocondriales, la actividad y cantidad de citocromo oxidasa, el consumo de oxígeno y el potencial de membrana interna entre híbridos portadores de los haplogrupos H y Uk asociándose estas diferencias con la predisposición a padecer enfermedades de origen multifactorial ²⁵⁵. En otro estudio se encuentra que los híbridos J poseen menores niveles de consumo de oxígeno, potencial de membrana interna y de *ATP* en comparación con híbridos portadores del haplogrupo H. Además los híbridos J presentaron menores niveles de contenido en ADNmt y ARNmt además de una menor producción de polipeptidos de origen mitocondrial y esto sería un factor clave de cara a la mayor susceptibilidad que presentan los individuos de este haplogrupo a sufrir la neuropatía óptica hereditaria de Leber ²⁵⁶. Estas diferencias metabólicas y celulares que se asocian con los diferentes haplogrupos hacen que según el haplogrupo portado se tenga una mayor o menor predisposición a padecer ciertas enfermedades.

En el caso de la enfermedad de Parkinson son los clúster UK y TJ los que presentan carácter protector frente a la enfermedad ^{254,257-259}. Mientras que el



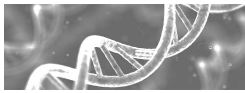
clúster HV y el haplogrupo H parecen otorgar una mayor predisposición a algunas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer debido a su mayor efectividad en la generación de *ATP* y consecuentemente una mayor producción de *ROS* ²⁶⁰. Más concretamente es el subhaplogrupo H5a, portador de la mutación A4336G, el que presenta un carácter de riesgo de cara a padecer Alzheimer ^{261,262}, mientras que los que presentan un comportamiento protector son los haplogrupos U y T ^{263,264}. Sin embargo no todas las relaciones establecidas entre haplogrupo y enfermedad se corroboran en todos los estudios. Como alternativa se ha propuesto que las diferentes variantes mitocondriales, que producen diferencias en los procesos de generación de energía y el funcionamiento de la mitocondria, pueden causar un incremento o una disminución en el riesgo de desarrollar Parkinson. Pero los resultados de los diferentes estudios que exploran esta posibilidad, hasta el momento, han ofrecido resultados ambiguos puesto que en unos casos se muestra una asociación significativa entre las variantes mitocondriales y la patología mientras que en otros estudios estas asociaciones no se han podido replicar²⁶⁰.

Las características metabólicas de los diferentes haplogrupos hacen que el haplogrupo H también se relacione con unos mayores niveles de supervivencia en pacientes que han sufrido una sepsis comparado con los portadores de los haplogrupos no-H, principalmente los haplogrupos J y T. En este caso la posible explicación de esta diferencia se atribuye a las diferencias en el metabolismo energético de los portadores del haplogrupo H. La explicación de la mayor supervivencia de los pacientes H puede venir dada por el hecho de una mayor producción de *ROS* asociada a este haplogrupo, debido a su mayor eficiencia en la producción de energía a través de la cadena de transporte electrónico, podría reducir las infecciones bacterianas actuando las *ROS* como un bactericida ²⁶⁵. Sin embargo en un estudio llevado a cabo en una cohorte española de pacientes que sufrieron sepsis severa es el cluster TJ el que presenta unos valores de mayor supervivencia a 30 días y 6 meses al compararlo con el resto de haplogrupos ²⁶⁶ por lo que es necesario llevar a cabo más estudios en diferentes poblaciones que amplíen el conocimiento sobre estas relaciones haplogrupo-enfermedad.

Otra evidencia de la influencia de la mitocondria y de los haplogrupos mitocondriales sobre el desarrollo y evolución de algunas patologías se puede observar en un trabajo de *Gomez-Fulgencio et al.* en una cohorte de pacientes, de origen caucásico, infectados por VIH sometidos a terapia antiretroviral; en este grupo de pacientes se ha observado que los portadores del haplogrupo H presentaban unos mejores porcentajes de recuperación de células CD4+ que los portadores del haplogrupo J lo que se puede relacionar con unos niveles de supervivencia mayores para los portadores del haplogrupo H ²⁶⁷. La causa de esta diferencia entre los haplogrupos H y J es probablemente su diferente comportamiento a nivel energético ya que los portadores del haplogrupo H son más eficientes energéticamente que los portadores del haplogrupo J. A su vez está mayor generación de *ATP* conlleva unos mayores niveles de *ROS*, que en principio podría ser perjudicial para la supervivencia celular y los procesos de apoptosis, sin embargo en este caso provoca un aumento de la inmunidad innata del organismo favoreciendo la proliferación de células CD4+. A lo anterior hay que añadir el incremento en los niveles de antioxidantes que se produce como respuesta al incremento en la producción de *ROS* ²⁶⁸.

También se ha encontrado relación entre los haplogrupos y la probabilidad de padecer diferentes tipos de cáncer (mama, colorectal y tiroideo) ²⁶⁹ en un estudio realizado sobre población china. Sin embargo estas relaciones no fueron replicadas en otros estudios sobre otras poblaciones en cánceres como el de páncreas ²⁷⁰, el cáncer epitelial invasivo de ovario ²⁷¹ o el cáncer de próstata ^{272,273}. Tampoco se ha encontrado relación entre los haplogrupos y la predisposición a padecer tuberculosis al evaluar una cohorte de pacientes que padecen dicha afección frente a una cohorte de pacientes sanos ²⁷⁴.

Además de las diferencias energéticas y de producción de *ROS* el ser portador de un haplogrupo puede provocar una alteración en la expresión de algunas de las principales rutas celulares como las de apoptosis, inmunidad o inflamación, tal y como muestran los trabajos con híbridos de *Kenney et al.*, en ellos se estudian las diferencias a nivel de expresión entre híbridos H y J, así como la respuesta a estímulos de estrés, empleando para ello radiación

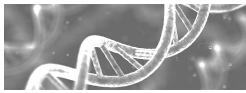


ultravioleta. Los resultados obtenidos muestran diferencias en la tasa de crecimiento celular y en los niveles de expresión de genes relacionados con inflamación, proliferación celular y apoptosis . De manera que los cíbridos J mostraron un incremento en los niveles de expresión relacionados con la proliferación celular y de inflamación, disminuyendo los niveles de expresión de los genes relacionados con la ruta de apoptosis, al compararlos con los niveles de los cíbridos H ^{275,276}. En otro trabajo al comparar los niveles de expresión de cíbridos portadores de un haplogrupo europeo (H) frente a cíbridos portadores de un haplogrupo africano (L) también se obtienen diferencias en la expresión génica de algunas de las principales rutas celulares como la inflamatoria y la de procesos inmunitarios, poniendo de manifiesto la influencia del genoma mitocondrial y sus variantes polimórficas sobre la expresión de genes nucleares ²⁷⁷.

1.8.3 Haplogrupos y artrosis

En cuanto a la influencia de los haplogrupos en la artrosis cabe destacar que los haplogrupos mitocondriales se han relacionado con el riesgo de sufrir artrosis de rodilla ²⁷⁸ en una cohorte de pacientes del noroeste de España. Los portadores del haplogrupo J muestran un menor riesgo de padecer artrosis de rodilla y en el caso de sufrir la patología la severidad de la misma es menor. Por su parte, los portadores del haplogrupo U presentan una mayor severidad de la enfermedad, a tenor de su grado radiológico. Estos resultados se replican en el caso del haplogrupo J en una cohorte de pacientes con artrosis de cadera en donde los portadores del haplogrupo J muestran un riesgo significativamente menor de sufrir artrosis de cadera ²⁷⁹. A nivel molecular se ha visto que los haplogrupos modulan los niveles en suero de biomarcadores moleculares del colágeno tipo-II de modo que los pacientes portadores del haplogrupo H son los que presentan niveles más elevados de biomarcadores de destrucción del colágeno mientras que los pacientes portadores del haplogrupo J son los que muestran niveles más bajos ²⁸⁰. Además los haplogrupos mitocondriales regulan los niveles de algunas MMPs en suero, de modo que los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo H son los que presentan unos niveles de

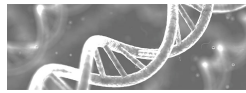
MMP-3 más elevados en comparación con los controles sanos; asimismo, los pacientes artrósicos muestran niveles significativamente mayores para la MMP-13, pero estos son más bajos en portadores del haplogrupo J en comparación con pacientes que presentan el haplogrupo H ²⁸¹. Una posible explicación a estas tendencias viene dada por el diferente metabolismo mitocondrial que presentan los distintos haplogrupos y que se traduce en un funcionamiento diferente del sistema de *OXPHOS* además de que los portadores del haplogrupo J presentan un menor consumo de oxígeno así como un menor daño oxidativo ^{255,282,283}. Este menor daño oxidativo se ve reflejado, no sólo en el menor acortamiento de la longitud del telómero que muestran los portadores del haplogrupo J frente a los no-J en un estudio sobre una población de pacientes artrósicos y controles sanos, sino también en el hecho de que los portadores de este haplogrupo muestran una menor producción de óxido nítrico, lo cual se relaciona directamente con la acción oxidante de *ROS* y de las especies reactivas de nitrógeno que provocan el envejecimiento celular y el acortamiento de los telómeros ²⁸⁴. A todo lo anterior hay que añadir que los portadores de haplogrupo J muestran niveles más elevados de catalasa, enzima antioxidante, en suero en una cohorte de pacientes artrósicos y controles sanos ²³⁴. Estos trabajos en población caucásica se refrendan en un trabajo posterior de Fang et al. en el que encontraron una relación significativa entre los haplogrupos mitocondriales y la prevalencia y progresión de la artrosis de rodilla en una cohorte de pacientes de origen asiático. En su estudio los portadores del haplogrupo G en combinación con la presencia del polimorfismo T16362C muestran un incremento en el riesgo de sufrir artrosis de rodilla además de una peor progresión de la enfermedad. Por el contrario, los portadores del haplogrupo B/B4 presentan una menor prevalencia a sufrir dicha patología. Además observan un incremento en la cantidad de ADNmt a nivel celular en los pacientes artrósicos con respecto a los controles sanos ²⁸⁵. Al igual que en otras patologías hay trabajos que no consiguen observar diferencias significativas en la distribución de los haplogrupos y la artrosis ²⁸⁶, si bien hay que decir que la población control de este trabajo la conforman controles asintomáticos de los que no existe constancia radiográfica de su



estado y se estima en hasta un 40% el número de controles asintomáticos de artrosis que muestran signos radiológicos de la enfermedad.

Tabla 9: Relación de los haplogrupos con la predisposición o protección frente a diferentes patologías.

PATOLOGÍA	HAPLOGRUPO	REFERENCIAS
MELAS	-Haplogrupo J y mutación m.3243a>g confiere carácter protector.	Pierron et al. 2008
ARM	-Haplogrupo H protector y haplogrupo J riesgo.	Jones et al. 2007; Mueller, 2012; Udar et al. 2009
Parkinson	-Clúster TJ y Uk factor protector mientras que clúster HV y haplogrupo H factor de riesgo.	van der Walt et al. 2003; Chezzi et al. 2005; Pyle et al. 2005; Latsoudis et al. 2008; Gaweda-Walerych et al. 2013
Alzheimer	-Sub-haplogrupo H5a unido a la mutación m.4336a>g factor de riesgo. Haplogrupos T y Uk carácter protector.	Santoro et al. 2010; Coskun et al. 2012; Chagnon et al. 1999; van der Walt et al. 2004
Esclerosis múltiple	- Haplogrupo U factor de riesgo.	Ban et al. 2008
Ataxia de Friedreich y enfermedad de Huntington	-Haplogrupo U retrasa la edad de aparición de la enfermedad y haplogrupo H la adelanta.	Giachetti et al. 2004; Arming et al. 2010
Pérdida auditiva	-Haplogrupo U factor de riesgo.	Manwaring et al. 2007
Retinopatía diabética	-Haplogrupo H riesgo y haplogrupo Uk factor protector.	Estopinal et al. 2014
Distrofia endotelial de Fuchs	-Haplogrupo I protector	Li et al. 2014
Supervivencia tras sepsis	-Haplogrupo H mayor supervivencia frente a no-H, haplogrupo J y T menor supervivencia.	-Baudouin et al. 2005
Cáncer de mama	-Clúster TJ mayor supervivencia a 30 días y 6 meses. -Haplogrupos H, X y K riesgo y haplogrupo U factor protector.	-Lorente et al. 2013 -Gutierrez-Povedano et al. 2013; Tipirisetti et al. 2013; Bai et al. 2007
Cáncer nasofaríngeo	-Haplogrupo H riesgo	Hu et al. 2014
Ateroesclerosis coronaria	-Haplogrupos A, M7a y T riesgo.	Sawabe et al. 2011; Kofler et al. 2009
Miocardopatía dilatada idiopática	-Haplogrupo H riesgo	Fernandez-Caggiano et al. 2012
Miocardopatía isquémica	-Haplogrupo H riesgo y haplogrupo J protector	Fernandez-Caggiano et al. 2013

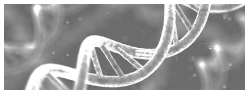


Miocardopatía hipertrófica	-Haplogrupo J y clúster Uk factor protector mientras que el haplogrupo H es un factor de riesgo.	Christiansen et al. 2014; Hagen et al. 2013
Accidente cerebrovascular isquémico	-Sub-haplogrupo H1 factor protector y clúster Uk factor de riesgo	Chinnery et al. 2010; Rosa et al. 2008
Enfermedad Coronaria	-Haplogrupo B5 factor de riesgo.	Jia et al. 2013
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS)	- Haplogrupo H menor riesgo de progresión en AIDS mientras que los portadores de los haplogrupos J y T presentan un mayor riesgo de progresión en el síndrome.	Hendrickson et al. 2008; Micheloud et al. 2011; Garcia-Alvarez et al. 2011
Diátesis atópica	- Haplogrupo U factor de riesgo.	Raby et al. 2007
Aterosclerosis e infarto de miocardio	-Haplogrupo H factor de riesgo.	Palacin et al. 2011
Diabetes	-Haplogrupos B4, G3, E2, V y U factor de riesgo mientras que el haplogrupo D4 actúa como factor protector.	Soini et al. 2012; Loo et al. 2014; Liou et al. 2012; Martikainen et al. 2013
Artrosis de rodilla	-Haplogrupo U riesgo y haplogrupo J protector. Haplogrupo U mayor severidad radiológica. -Haplogrupo G junto con la presencia del polimorfismo m.16362t>c se relacionan con riesgo de OA además de con una peor progresión mientras que el haplogrupo B factor protector frente a OA.	Rego-Perez et al. 2008 Fang et al. 2014
Artrosis de cadera	-Haplogrupo J protector	Rego-Perez et al. 2010
Obesidad	-Haplogrupo W y X son factor protector y haplogrupo T factor de riesgo.	Knoll et al. 2014; Yang et al. 2011; Nardelli et al. 2013
Hipertensión	-Haplogrupo J tendencia a menor presión arterial. -Haplogrupos D5a y G2a1 factores de riesgo.	Rea et al. 2013 Chen et al. 2012; Lu et al. 2011

1.9 INTERACCIÓN NÚCLEO-MITOCONDRIA

La interacción núcleo-mitocondria se ha establecido y ha evolucionado desde el momento de la creación de las células eucariotas que surgieron de la simbiosis entre la proto-célula eucariota y una protobacteria oxidativa, la proto-mitocondria ²⁸⁷⁻²⁸⁹. A lo largo de miles de años de simbiosis entre célula y mitocondria sus mecanismos moleculares han ido evolucionando ²⁹⁰ de manera que el núcleo de la célula ejerce un control sobre el crecimiento y la replicación de la mitocondria a cambio de incorporar partes del genoma mitocondrial en el propio material genético nuclear ²⁸⁹. El desarrollo de estos mecanismos ha permitido que se coordine la regulación de los genes mitocondriales según las necesidades de energía, crecimiento y reproducción de la célula requeridas a través del núcleo. La evolución en la simbiosis de esta relación ha dado lugar a una especialización en las funciones de cada parte, de manera que la mitocondria es la encargada de la producción energética de la célula ¹⁸⁴.

Dentro de la mitocondria podemos encontrar más de mil proteínas de las cuales el genoma mitocondrial solo codifica 13 o, lo que es lo mismo, el resto son codificadas por el ADN nuclear e importadas a la mitocondria (Figura 17) ²⁹¹. La señalización retrógrada de la mitocondria hacia el núcleo es la responsable de la regulación de la expresión de los genes nucleares como respuesta a cambios en la función respiratoria mitocondrial ^{292,293}. En la regulación de la actividad mitocondrial se da por tanto un flujo de información bidireccional entre mitocondria y núcleo. Existen diversos mecanismos que se cree pueden controlar o que participan en esta regulación retrógrada como es la regulación de los niveles de Ca^{+2} por parte de la mitocondria ²⁹⁴. El proceso de señalización retrógrada tiene como finalidad subsanar los defectos mitocondriales que pueden causar una ineficiente o defectuosa producción de *ATP*. En este proceso la mitocondria activa la expresión de diferentes genes nucleares necesarios para mantener un estado celular homeostático, este proceso de señalización interactúa con otras importantes rutas de señalización como las rutas de transducción de señales *TOR (Target Of Rapamycin)* y de las ceramidas todos ellos procesos de respuesta a estrés celular ²⁹⁵. La respuesta



retrógrada se asocia también con los procesos de autofagia y mitofagia y tiene un papel clave en la supervivencia celular ²⁹⁶.

La biogénesis mitocondrial está coordinada por tres proteínas de la familia peroxisoma proliferador activado del receptor gamma. Estas proteínas activan los factores nucleares respiratorios que regulan la mayoría de los genes nucleares que codifican subunidades de los cinco complejos respiratorios de la cadena de transporte electrónico mitocondrial ^{297,298}. Además también interaccionan con genes encargados de la replicación y transcripción del genoma nuclear ²⁹⁹.

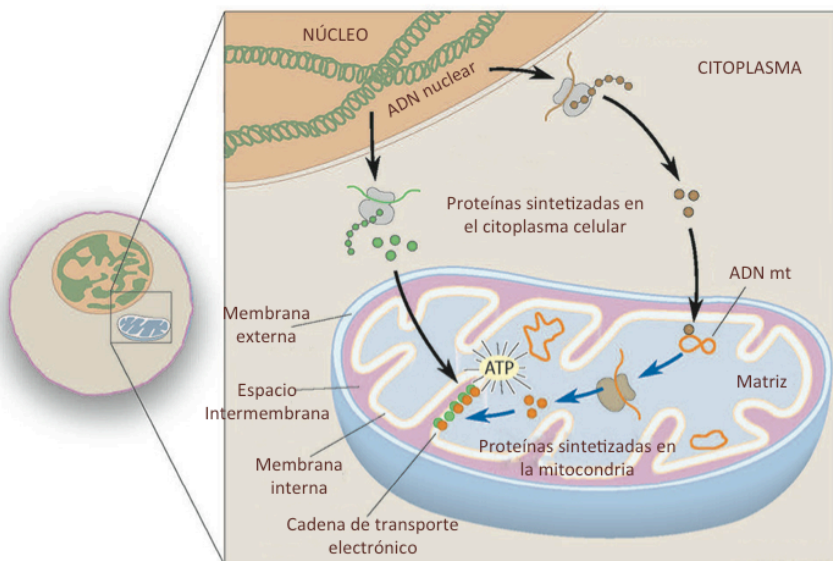


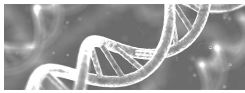
Figura 17: Participación del núcleo en los procesos mitocondriales. Las proteínas codificadas por el núcleo participan en numerosos procesos mitocondriales como los de síntesis proteica y de generación de ATP a través de la cadena de transporte electrónico. Imagen adaptada de Larsson 2010.

El hecho de que de las aproximadamente 1500 proteínas que se encuentran en la mitocondria solo 13 sean codificadas por el genoma mitocondrial nos da idea de la influencia de la actividad del núcleo celular sobre el metabolismo mitocondrial y, consecuentemente, sobre la aparición de posibles patologías mitocondriales ³⁰⁰. El correcto funcionamiento de la CTE es controlado tanto por el genoma nuclear como por el mitocondrial ³⁰¹. Las mutaciones presentes en el genoma nuclear que afectan a genes que codifican

para proteínas mitocondriales necesarias para la producción de *ATP* causan diversas alteraciones que pueden afectar a cualquier órgano y función ³⁰².

El origen de las patologías mitocondriales se encuentra en disfunciones a nivel molecular, en la mayoría de los casos por alteraciones en el sistema de *OXPHOS*, que pueden ser causadas por mutaciones mitocondriales o nucleares ^{303,304}. Estas proteínas de origen nuclear que actúan en la mitocondria participan en la construcción de los complejos de *OXPHOS*, factores asociados con la replicación y la transcripción, entre otros. Así, tenemos mutaciones patogénicas en genes nucleares que codifican para subunidades estructurales (complejos I, II, III, IV y V) y factores de ensamblaje de *OXPHOS* ³⁰⁵, mientras que otras mutaciones se asocian con alteraciones en la síntesis de proteínas mitocondriales que requieren de factores y enzimas, codificados por el núcleo, para la maduración del ARN ribosomal y de transferencia ³⁰⁶. El proceso de replicación mitocondrial requiere a su vez de la actuación no sólo de proteínas mitocondriales sino también de ciertas proteínas de origen nuclear ³⁰¹. Existen mutaciones a nivel del genoma nuclear que pueden causar alteraciones sobre diferentes aspectos del genoma mitocondrial como pueden ser deleciones que provocan la aparición de patologías neurodegenerativas ³⁰⁷. Estas alteraciones sobre el genoma mitocondrial pueden afectar al sistema de mantenimiento, reparación y expresión del ADNmt ^{308,309}, al transporte de nucleósidos ³¹⁰ o a las proteínas de mantenimiento de la MMI ³¹¹. El genoma nuclear puede controlar la expresión fenotípica de mutaciones patológicas en el ADNmt potenciándola o reprimiéndola ³⁰⁵. Como ejemplo se puede citar la enfermedad de Leigh en la que se han identificado mutaciones en regiones del genoma nuclear que codifican para subunidades de los complejos I y II, así como mutaciones en el gen *SURF1* que codifica para una proteína necesaria para el ensamblaje del complejo IV ³¹².

. La interacción núcleo-mitocondria puede provocar un incremento en la severidad de la miocardiopatía si se posee el haplogrupo U comparado con los portadores del haplogrupo H ³¹³. Además las diferencias bioenergéticas de híbridos de los haplogrupos H y J pueden contribuir a las diferencias observadas en la expresión de genes nucleares relacionados con el



complemento alternativo, la inflamación y la apoptosis en el caso de la maculopatía degenerativa relacionada con la edad ³¹⁴. El genoma mitocondrial juega un papel clave en el desarrollo de la nefropatía diabética aparte de los factores genéticos nucleares implicados en dicha dolencia ³¹⁵.

1.10 OSTEOARTHRITIS INITIATIVE (OAI)

En la actualidad no existe un tratamiento específico para tratar la artrosis, además hay que añadir que el diagnóstico de la patología se realiza normalmente en fases avanzadas de la enfermedad por lo que el único tratamiento efectivo es la cirugía de reemplazo articular. Ante esta situación la administración sanitaria de los Estados Unidos centró sus esfuerzos en la creación de la *OAI*. La *OAI* es una iniciativa creada en el año 2002 por el *National Institute of Health* norteamericano cuyos objetivos se centran en la búsqueda de biomarcadores genéticos, bioquímicos y de imagen así como de nuevos tratamientos que frenen el desarrollo y la progresión de la artrosis de rodilla. Para alcanzar estos objetivos la *OAI* pretende ser una plataforma abierta a toda la comunidad científica permitiendo un acceso público a los datos que se recaben durante el estudio y todos aquellos que sean generados por los diferentes grupos de investigación que participen en el proyecto ³¹⁶.

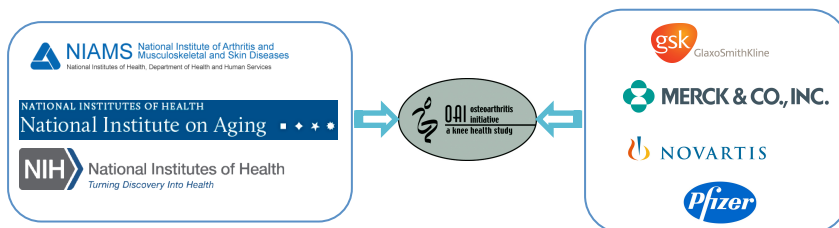


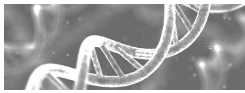
Figura 18: Miembros fundadores de la OAI. En la OAI participan instituciones públicas de la administración de Estados Unidos y también empresas privadas.

Se trata de un estudio multicéntrico con participación de diferentes instituciones públicas y privadas en el que existen cuatro centros de reclutamiento de pacientes, los hospitales asociados a las universidades de Ohio, Maryland, Pittsburg y Rhode Island, y que tiene como centro de coordinación la Escuela de Medicina de la Universidad de California en su sede

de San Francisco ⁷⁷ (Figura 18). En estos centros se recogen, clasifican y almacenan los datos clínicos, radiológicos (en formato de imagen) así como las muestras biológicas de los 4796 participantes que son reclutados en el inicio del estudio ³¹⁷. Los participantes se clasificaron en tres grupos diferentes: 1396 participantes con artrosis de rodilla sintomática (dolor frecuente y signos radiográficos definidos) en al menos una de las rodillas se agruparon en la **cohorte de progresión**; 3278 participantes con un elevado riesgo de desarrollar artrosis sintomática (presentaban dolor articular o signos radiográficos definidos) en al menos una de las rodillas se agruparon en la **cohorte de incidencia**; 122 participantes que no presentaban signos de artrosis sintomática ni riesgo de desarrollarla conformaron la cohorte de **controles sanos** ³¹⁶. Más detalladamente, los criterios de inclusión para formar parte de la cohorte de progresión son presentar síntomas de artrosis, ya sea rigidez articular o dolor de un modo puntual o continuo, durante un periodo de un mes en el año anterior a la fecha de inicio del estudio y además presentar signos radiológicos definidos de la enfermedad a través de la presencia de osteofitos con un valor de graduación en la escala atlas de la *OARSI* entre 1-3 equivalente a un grado ≥ 2 en la escala *KL*.

Los participantes incluidos en el estudio pertenecen a diferentes grupos étnicos (razas caucásica, afroamericana y asiática) con una edad comprendida entre los 45 y los 79 años. La distribución por sexos muestra que las mujeres representan el 58% del total de participantes en el estudio.

Cada centro participante en la *OAI* posee las instalaciones, los equipamientos, los materiales y el personal adecuado para llevar a cabo la recolección de muestras (sangre y orina) y la realización de las pruebas radiológicas de imagen de las articulaciones (radiografías y resonancias). Además de los datos de imagen de las articulaciones se recogen en cada visita programada los datos clínicos así como todos aquellos factores de riesgo que puedan incidir sobre la progresión o la aparición de la artrosis de rodilla. Para obtener todos estos datos de relevancia para el estudio de los factores de riesgo de la artrosis de rodilla se emplean cuestionarios normalizados en los que se evalúa y registra: la presencia de dolor en la rodilla, la rigidez articular, la



inflamación de la articulación, la sensibilidad al dolor, la limitación de movimiento, el dolor y la presencia de artrosis en otras articulaciones, el uso de medicamentos para el dolor y/o la artrosis así como las discapacidades en las actividades físicas debidas al dolor y la artrosis. Entre los cuestionarios utilizados para registrar los datos relativos al dolor y las capacidades físicas de los individuos se incluyen el índice *WOMAC*, el índice *KOOS* y el cuestionario *SF-12 (Medical Outcomes Study Short Form 12)*. La evaluación de los factores de riesgo implicados en el inicio y progresión de la artrosis de rodilla incluye cuestiones y exámenes físicos para detectar la presencia de artrosis en otras articulaciones, el historial de daños en la rodilla así como las cirugías en dicha articulación, los esfuerzos biomecánicos anormales causados por un mal alineamiento de la rodilla, la presencia de obesidad y actividades físicas pesadas, los factores nutricionales y el uso de medicamentos y suplementos alimenticios.

En su búsqueda de biomarcadores para la artrosis, la *OAI* se plantea como uno de los objetivos primordiales desarrollar y validar biomarcadores estructurales de imagen para la artrosis de rodilla. Para alcanzar este objetivo dispone del equipamiento adecuado para realizar resonancias magnéticas y radiografías de las rodillas de los participantes en el estudio en cada uno de los centros de reclutamiento. A través de la resonancia magnética se evalúan los compartimentos tibio-femoral y rotula-tróclea en ambas rodillas mientras que con las radiografías se evalúa el compartimento tibio-femoral, siendo la pérdida de espacio articular en este último el estándar frente al que se evalúan los biomarcadores que puedan encontrarse durante el estudio. Las imágenes radiográficas y de resonancia se obtienen anualmente y son evaluadas por personal entrenado en la asignación de la presencia de osteofitos y la reducción de espacio articular según la graduación de las escalas de la *OARSI*. Mediante las imágenes radiográficas se pueden obtener la anchura de espacio articular, el grado *KL*, la presencia de osteofitos y de esclerosis subcondral entre otros parámetros. La imágenes de resonancia magnética poseen la suficiente calidad como para poder medir el grosor y el volumen de cartílago en las diferentes zonas en las que se puede dividir la articulación ⁷⁷.

El seguimiento anual de los parámetros en estudio que se realiza en la cohorte de la *OAI* permite establecer correlaciones entre los diferentes factores que conforman la enfermedad incluyendo cambios estructurales, radiográficos y de resonancia, así como dolor o incapacidad. Este seguimiento anual convierte a la *OAI* en una excelente cohorte prospectiva, permitiendo desarrollar trabajos con un seguimiento de 10 años de duración desde el principio del estudio, en el año 2004 ⁷⁷.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

En la actualidad no existe ningún biomarcador de artrosis aceptado para su uso en la clínica, por este motivo la investigación de posibles marcadores genéticos que ayuden a realizar un diagnóstico temprano, o incluso el pronóstico de la enfermedad, supone un gran reto y proporcionaría un notable avance en el diagnóstico preventivo de la artrosis.

El principal objetivo de esta tesis es estudiar si los haplogrupos mitocondriales son biomarcadores diagnóstico y pronóstico en la artrosis. Del objetivo principal de esta tesis se derivan los siguientes objetivos particulares:

1. Evaluar si los haplogrupos mitocondriales se asocian con la prevalencia de la artrosis en diferentes cohortes mundiales.
2. Analizar si los haplogrupos mitocondriales influyen en la progresión de la artrosis de rodilla
3. Estudiar el perfil de biomarcadores séricos del cartílago que se asocian con los haplogrupos mitocondriales en los pacientes con artrosis

III. CAPÍTULOS

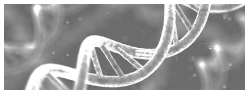
3.1 CAPITULO I

“mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations”

Resumen capítulo I: *mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations*

La artrosis es la principal enfermedad reumática y una de las principales causas de incapacidad laboral además de ocupar un elevado número de citas de atención primaria. La artrosis es una enfermedad compleja de origen multifactorial en la que intervienen factores biomecánicos, ambientales y genéticos, entre otros.

Aunque la principal vía para la obtención de energía en los condrocitos es la glucolítica, diferentes trabajos han puesto de manifiesto la influencia de la mitocondria en el proceso artrósico. La mitocondria representa una de las rutas más importantes en la apoptosis del condrocito, además es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno provocando alteraciones en las funciones biológicas del condrocito. La relación entre mitocondria y artrosis va más allá desde el punto de vista genético ya que se ha relacionado la presencia de diferentes polimorfismos en el ADN mitocondrial, que definen los denominados como haplogrupos mitocondriales, con una menor predisposición a padecer artrosis de rodilla. También se ha comprobado que los haplogrupos mitocondriales intervienen en procesos biológicos como la regulación de los niveles de biomarcadores de artrosis y de metaloproteasas, además de la producción de óxido nítrico en los condrocitos y la longitud de los telómeros en leucocitos. La posible causa de estas diferencias entre los distintos haplogrupos es la selección natural de los polimorfismos que producen una mejor adaptación a las condiciones climáticas. De acuerdo con esta teoría la selección climática tuvo lugar durante las diferentes glaciaciones y darían lugar a variaciones en la eficiencia del acoplamiento de la cadena de transporte electrónico (CTE) en los haplogrupos europeos. De este modo, algunos haplogrupos poseen una menor eficiencia en el acoplamiento de la CTE a cambio de generar mayor calor con una menor producción de *ATP*, una menor producción de ROS y de apoptosis. Este mecanismo puede incrementar el riesgo de sufrir dolencias causadas por deficiencias en la producción de *ATP*



pero a la vez puede resultar protector para aquellas enfermedades degenerativas asociadas con el estrés oxidativo.

De acuerdo con todo lo anterior el objetivo de este trabajo es analizar la distribución de frecuencias de los haplogrupos europeos en dos cohortes de pacientes artrósicos de diferentes áreas geográficas europeas y que tienen distintos patrones climáticos desde la antigüedad.

En este trabajo se han utilizado dos cohortes de pacientes de raza caucásica: una cohorte del Reino Unido constituida por 453 pacientes con artrosis de rodilla sometidos a una cirugía de reemplazo articular y 280 controles sanos ; y otra cohorte, en este caso del Noroeste de España, formada por 1471 pacientes con artrosis de rodilla y/o cadera, según los criterios del *ACR*, y 406 controles sanos de artrosis.

Se asignaron los haplogrupos mitocondriales en las dos cohortes de estudio partiendo del ADN total de las muestras y realizando una reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, del inglés *polymerase chain reaction*) de manera que se amplifican las regiones que contienen 6 polimorfismos discriminatorios que permiten identificar los haplogrupos europeos más comunes. Posteriormente estos productos de *PCR* fueron purificados y sometidos a una *PCR* de extensión en base simple (*SBE*, del inglés *single base extension*) cuyos productos fueron cargados en un secuenciador automático de ADN para la detección y visualización de los polimorfismos. Para la asignación de los haplogrupos europeos menos comunes se utilizó la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (*RFLP*, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Para determinar los subtipos del haplogrupo J se empleó la técnica de *SBE* mientras que para la identificación de otras variantes genéticas mitocondriales se usó la secuenciación convencional.

Los resultados sobre la cohorte del Noroeste de España mostraron que la frecuencia del haplogrupo J y del clúster TJ era significativamente menor en los pacientes artrósicos incluso cuando se aplicó un modelo de regresión logística ajustado por edad y sexo. En la cohorte del Reino Unido, fue el haplogrupo T el que mostró una frecuencia significativamente menor en los

pacientes artrósicos. Además en la cohorte del Reino Unido la presencia de la variante mitocondrial asociada al haplogrupo J m.3394t>c fue significativamente menor que en la cohorte española.



Contents lists available at ScienceDirect

Mitochondrion

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mito

mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations

A. Soto-Hermida^{a,c}, M. Fernández-Moreno^{a,c}, N. Oreiro^{a,c}, C. Fernández-López^{a,c},
I. Rego-Pérez^{a,c,*}, F.J. Blanco^{a,b,c,*}

^a Grupo de Genómica, Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas, Universidade da Coruña (UDC), As Xubias, 15006, A Coruña, España

^b CIBER-BBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^c RETIC-RIER, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain



ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2013

Received in revised form 29 January 2014

Accepted 3 March 2014

Available online 12 March 2014

Keywords:

Mitochondria
mtDNA haplogroups
mtDNA sequence
Osteoarthritis
Uncoupling

ABSTRACT

Objective: To compare the frequency distribution of the mtDNA haplogroups in OA patients and healthy controls between the United Kingdom (UK) and Spain.

Methods: We used the single base extension (SBE) assay to obtain the European mtDNA haplogroups in 1471 OA patients and 406 healthy controls from Spain, and 453 OA patients and 280 healthy controls from the UK. Some differential haplogroup J-related single nucleotide polymorphisms (SNPs) between both populations were analyzed. The whole data was analyzed with SPSS software (v.18) following appropriate approaches that included chi-square contingency tables and logistic regression models adjusting by gender and age.

Results: The haplogroup J appeared underrepresented in OA patients from Spain when compared with healthy controls (OR = 0.636; 95% CI: 0.444–0.911; $p = 0.013$). Individuals from the UK carrying the haplogroup T showed a decreased risk of OA (OR = 0.574; 95% CI: 0.350–0.939; $p = 0.027$). The comparison of the frequency distribution of the haplogroup J between the UK and Spain showed a decreased presence of this haplogroup in healthy controls from the UK when compared with healthy controls from Spain that is in borderline of the statistical significance ($p = 0.06$). The analysis of some haplogroup J-related SNPs in OA patients and healthy controls from Spain and the UK showed that the SNP m.3394t>c appeared underrepresented in the UK cohort ($p = 0.038$).

Conclusions: The proposed mitochondrial uncoupling mechanism derived from the mtDNA haplogroups J and T could be behind their protective role against OA. The different association found in Spain and the UK could reflect the adaptation of the mtDNA haplogroups to different climatic patterns. The genetic composition of the haplogroup J between the UK and Spain seems to be slightly different, being the m.3394t>c SNP one of the differentially expressed haplogroup J-related polymorphisms.

© 2014 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

1. Introduction

Osteoarthritis (OA), the most common form of joint disease and cause of musculoskeletal disability in elderly people, is a disease affecting articular cartilage, bone and soft tissue leading to joint destruction and severe impairment of mobility (Felson and Zhang, 1998). It is also the main cause of work incapacity and one of the most common reasons for visiting primary physicians. OA is a multifactorial disease, influenced

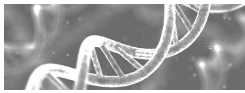
by both environmental and genetic risk factors (Southam et al., 2011; Valdes and Spector, 2011).

Despite the glycolytic nature of articular chondrocytes, a growing body of evidence suggests that mitochondria are involved in the pathogenesis of OA (Blanco et al., 2011; Terkeltaub et al., 2002). A significant decrease in complex II and III activity in OA chondrocytes compared with normal chondrocytes has been demonstrated (Maneiro et al., 2003), the apoptotic mitochondrial pathway is implicated as one of the major cellular pathways of apoptosis in OA chondrocytes (Kim and Blanco, 2007), the inhibition of complexes III and V of the mitochondrial respiratory chain (MRC) causes an increased inflammatory response potentially relevant to the production of reactive oxygen species (ROS) (Cillero-Pastor et al., 2008), and mitochondrial-free radical production compromises chondrocyte function (Blanco et al., 2004; Henrotin and Kurz, 2007) causing mtDNA damage and reduced mtDNA capacity for repair (Grishko et al., 2009).

* Correspondence to: I. Rego-Pérez, Grupo de Genómica, Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), 15006-A Coruña, Spain. Tel.: +34 981 176399; fax: +34 981 176398.

** Correspondence to: F.J. Blanco, Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), 15006-A Coruña, Spain. Tel.: +34 981 176399; fax: +34 981 176398.

E-mail address: francisco.blanco.garcia@sergas.es (F.J. Blanco).



A new mitochondria-related genetic association has been described in OA, the mtDNA haplogroups. Briefly, each mtDNA haplogroup is defined as an individual group characterized by the presence of a particular set of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the mtDNA sequence (Torrioni et al., 1996). Recent findings showed that mtDNA haplogroup J is a protective factor for knee (Rego-Perez et al., 2008) and hip OA (Rego et al., 2010) in Spanish populations, and also modulates the serum levels of type II collagen OA-related molecular biomarkers (Rego-Pérez et al., 2010) and metalloproteinases (Rego-Perez et al., 2011), as well as the nitric oxide production by chondrocytes and telomere length in peripheral blood leukocytes (Fernández-Moreno et al., 2011). The proposed mechanism relies on the different performance of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) among the mtDNA haplogroups, even making that some of these mtDNA haplogroups are clearly biochemically different among them (Martínez-Redondo et al., 2010; Wallace, 1999).

The presumable cause of this behavior is the role that selection has played in shaping regional mtDNA variation, being the climate one of the selective influences, so ancient mtDNA variants permitted humans to adapt to colder climates (Mishmar et al., 2003; Ruiz-Pesini et al., 2004; Wallace et al., 2003). According to this theory, the cold selection that took place during the episodic periods of cold associated with the repeated continental glaciations (Ambrose, 1998) influenced the coupling efficiency of the electron transport chain (ETC) in European mtDNAs. This resulted in a proportionately more heat production (uncoupled efficiency) to be advantageous in cold climates (Brand, 2000), at the expense of a lower ATP production, thereby reducing ROS production and apoptosis (Ruiz-Pesini et al., 2004). While this sequence could represent a risk factor for diseases caused by ATP deficiency (i.e., LHON, multiple sclerosis), it would be protective for degenerative diseases caused by oxidative stress (i.e., Parkinson, aging-associated diseases, OA?).

With all this background, and taking into account that most of the European mtDNA haplogroups were introduced into Europe from the Near East around the time of the Last Glacial Maximum (Richards et al., 1998) and the Franco-Cantabria area was considered one of the main refugia for human populations during the height of the last Ice Age, an era of great climatic uncertainty (Pala et al., 2012), the aim of this work is to analyze the frequency distribution of the European mtDNA haplogroups in two OA cohorts of populations from different geographic locations and different ancestral climatic patterns. To perform this study, we analyzed a well characterized cohort of knee OA patients and healthy controls from the UK, and compared this frequency with that of the well characterized cohort of knee and hip OA patients and healthy controls from the north of Spain.

2. Materials and methods

2.1. Patients and controls

The Spanish cohort analyzed in this study is an updated and larger cohort used in previous studies, and consisted of 1471 unrelated North Spanish patients (994 females and 477 males) from Hospital Universitario A Coruña, diagnosed as having primary knee and/or hip OA following the American College of Rheumatology (ACR) criteria (Altman et al., 1986). The radiological stage of the disease was a Kellgren and Lawrence (1957) grade II or more in all cases, with over 73% being grade IV. The average age of the cases was 69 years with an age range of 42–98 years. The donors who met the inclusion criteria for healthy controls assessed by anamnesis, clinical examination and radiographic studies included 406 individuals (244 females and 162 males), of which 200 visited the hospital for ailments unrelated to OA, and the remaining 206 consisted of macroscopically healthy knees obtained from cadavers as well as healthy hips that suffered joint fracture. The average age for the healthy controls was 66 years, with an age range of 42–95 years. In all cases, informed consent and the agreement

of the ethical committee from Galician Health Administration were obtained.

The cohort from the UK has been previously described in detail (Southam et al., 2007). The cases were ascertained through the Nuffield Orthopaedic Centre in Oxford (n = 453; 275 females and 178 males). They had undergone total joint replacement of the knee for primary OA. The cases were also ascertained using the criteria of signs and symptoms of OA sufficiently severe to require joint replacement surgery. The radiological stage of the disease was a Kellgren and Lawrence (1957) grade II or more in all cases, with over 90% being grade III or IV. The average age of the cases was 73 years with an age range of 53–89 years. The control group comprised 280 individuals (96 females and 184 males) with no signs or symptoms of arthritis or joint disease. The average age of the controls at recruitment was 71 years, with an age range of 51–88 years. Similarly to the cohort from Spain, ethical approval for the study was obtained from appropriate ethics committees.

Both cohorts from Spain and the UK consisted of individuals of Caucasian origin exclusively.

2.2. mtDNA haplogroup genotyping

The mtDNA haplogroups were assigned in total isolated DNA by a well described method (Rego-Perez et al., 2008). Briefly, a multiplex PCR was performed to amplify 6 mtDNA fragments that contain each of the informative SNPs that characterize the most common European mtDNA haplogroups (H – including V and HV*, U – including the UK subtypes, J and T). The resulting PCR fragments were further purified and analyzed by single base extension (SBE) assay and the informative SNPs were visualized after loading the purified SBE product into an ABI 3130 XL genetic analyzer (Applied Biosystems). The less common haplogroups (W, I, X and other non-European variants) were assessed by means of PCR-RFLP according to the hierarchical scheme described elsewhere (Macaulay et al., 1999). All the primers and conditions used for the mtDNA haplogroup assignment are available in Rego-Perez et al. (2008).

The genotyping of the SNPs m.14798t>c (sub-haplogroup J1c), m.15257g>a (sub-haplogroup J2a) and m.3394t>c was performed by both SBE assay (m.14798t>c and m.15257g>a) and direct sequencing of the PCR product (m.3394t>c). The primers for the amplification of the fragment containing the SNP m.3394t>c were: 3192F (5'-CTT AGT ATT ATA CCC ACA CCC A-3') and 3560R (5'-ACT AGA AGA GCG ATG GTG AG-3'), the primer 3192F being subsequently used for the sequencing of the PCR product.

The primers and conditions used for the assignment of the SNPs m.14798t>c and m.15257g>a are available in Rego-Perez et al. (2008).

2.3. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS software, release 18 (Chicago, USA). As a first approach, the frequencies of the most common haplogroups between cases and controls for each of the two populations were compared using the chi-square test from contingency tables. Odds ratios (ORs) and their 95% confidence interval (CI) were also calculated to assess the odds of carrying each mtDNA haplogroup in OA cases compared to controls. To carry out this analysis, we followed a previously described approach, comparing each haplogroup with all other haplogroups pooled into one group (Rego-Perez et al., 2008). Similarly, the chi-square test from contingency tables was also used to compare the frequency of the most common mtDNA haplogroups and candidate differential SNPs between the two populations analyzed. For all cases, the Bonferroni correction for multiple comparisons was applied and consequently, p-values were multiplied by the number of outcomes tested in each case. As an additional statistical approach, logistic regression analyses adjusting for confounder variables age and gender were also performed to assess the incidence of the mtDNA haplogroups in both populations.

3. Results

3.1. Frequency distribution of the mtDNA haplogroups in the Spanish cohort

The resulting haplogroup frequencies of the 1471 OA cases and 406 healthy controls of the Spanish cohort are summarized in Table 1. The frequencies obtained ranged from 44.8% for the most common European mtDNA haplogroup H to 8.2% for the haplogroup J. We included into the group “Others” the less frequent haplogroups V, HV^a, I, W, and X, so that 11.6% of the controls and 16.2% of the OA cases were classified in this group.

The frequency of haplogroup J was significantly lower in OA cases than in healthy controls when each haplogroup was compared to all other haplogroups pooled together (OR = 0.614; 95% CI: 0.426–0.884; p = 0.008), even after the Bonferroni correction (p = 0.040) (Table 1). Since several of the haplogroups share a common root, this enabled us to obtain the frequencies of clusters TJ and HV. The frequency of the European specific mitochondrial cluster TJ was also significantly lower in OA cases when compared with healthy controls (OR = 0.694; 95% CI: 0.528–0.913; p = 0.009; adjusted p = 0.018) (Table 1).

When a logistic regression analysis adjusted for gender and age was performed (Table 3), we detected the same trend so the mtDNA haplogroup J appeared as a protective factor against OA in Spain (OR = 0.636; 95% CI: 0.444–0.911; p = 0.013).

3.2. Frequency distribution of the mtDNA haplogroups in the UK cohort

The resulting haplogroup frequencies of the 453 OA cases and 280 healthy controls of the UK cohort are summarized in Table 2. The frequencies obtained ranged from 41.2% for the most common European mtDNA haplogroup H to 7.9% for the haplogroup J. For this cohort, 11.8% of the controls and 15.2% of the OA cases were classified as “Others”.

The haplogroup T was significantly less represented in OA cases than in healthy controls when each haplogroup was compared to all other haplogroups pooled together (OR = 0.581; 95% CI: 0.365–0.926; p = 0.021) (Table 2). However, when corrected for multiple testing the p-value is in borderline of the statistical significance (p = 0.105). The frequency of haplogroup J showed a non-significant trend towards a decreased presence in the healthy controls compared to OA cases (OR = 1.686; 95% CI: 0.929–3.061; p = 0.083; adjusted p = 0.415). The frequencies of clusters KU and TJ were also calculated, but we did not find significant differences between OA cases and healthy controls (Table 2).

The logistic regression analysis showed a significant influence of the mtDNA haplogroup T as a protective factor against OA in the UK cohort

(OR = 0.574; 95% CI: 0.350–0.939; p = 0.027) (Table 3), therefore reinforcing the data obtained in the bivariate approach.

3.3. Comparison of the frequency distribution of the mtDNA haplogroups in UK and Spanish cohorts

The frequency distribution of the most common haplogroups did not differ statistically between the two populations analyzed (statistical significance not shown). However, when stratified by diagnosis, we found differences in the frequency distribution of the mtDNA haplogorup J between healthy controls from the UK and Spain, so healthy controls from the UK showed a lower frequency of the mtDNA haplogroup J than the healthy controls from Spain (5.7% vs 11.3%; p = 0.012), bordering the statistical significance when corrected for multiple testing (p = 0.060) (Table 4). On the contrary, the frequency distribution of the mitochondrial clusters analyzed did not show differences between both populations.

3.4. Analysis of the mtDNA haplogroup J-related SNPs in the UK and Spain

Of the 1877 cases and controls from the Spanish cohort, 153 carried the mtDNA haplogroup J. The SNPs m.14798t>c, m.15257g>a and m.3394t>c were genotyped in 149 samples. Of the 733 cases and controls from the UK cohort, 58 carried the mtDNA haplogroup J, so the SNPs m.14798t>c, m.15257g>a and m.3394t>c were genotyped in the whole 58 samples. The frequency distribution of these SNPs between the two populations is summarized in Table 5. The results obtained showed that the SNP m.3394t>c was underrepresented in the cohort from the UK (p = 0.038; adjusted p-value = 0.114). Stratifying the frequencies of these three SNPs by diagnosis, we did not find significant associations between the two populations analyzed, however a decreased frequency of the SNP m.3394t>c in OA patients from the UK was detected (data not shown).

4. Discussion

Previous studies had shown a significant influence of the mtDNA haplogroup J in Spanish cohorts of OA as a protective factor (Rego et al., 2010; Rego-Perez et al., 2008) and this association was replicated in the present study in an updated and larger cohort of Spanish samples (additional analyses of the new Spanish cases, in relation to our previous studies, are shown in Supplementary Table 1); however, the results of this work indicate that this mitochondrial variant showed no association with the OA disease in the UK. On the contrary, a lower frequency of the haplogroup T in OA patients from the UK was found. Although after the Bonferroni adjustment, differences in the

Table 1
Frequencies and odds ratios (ORs) of mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and clusters in OA patients and healthy controls from the Spanish cohort.

	Control	OA	Total	OR	95% CI		Nominal p-value	Adjusted p-value
	(n = 406)	(n = 1471)	(n = 1877)		Lower CI	Upper CI		
<i>Haplogroups</i>								
H	179 (44.1)	661 (44.9)	840 (44.8)	1.035	0.829	1.291	0.761	1.000
J	46 (11.3)	107 (7.3)	153 (8.2)	0.614	0.426	0.884	0.008*	0.040**
T	42 (10.3)	130 (8.8)	172 (9.2)	0.840	0.582	1.212	0.351	1.000
U ^a	92 (22.7)	335 (22.8)	427 (22.7)	1.006	0.774	1.308	0.961	1.000
Others	47 (11.6)	238 (16.2)	285 (15.1)	1.474	1.057	2.056	0.022*	0.110
<i>Clusters^b</i>								
Cluster HV	196 (48.3)	761 (51.7)	957 (51.0)	1.137	0.913	1.417	0.252	0.504
Cluster TJ	88 (21.7)	237 (16.1)	325 (17.3)	0.694	0.528	0.913	0.009*	0.018**

Values are number of samples with percentage in parentheses.

OR = odds ratio.

CI = confidence interval.

* Statistical significance (p < 0.05) before Bonferroni correction.

** Statistical significance (p < 0.05) after Bonferroni correction.

^a The haplogroup U data include the K subgroup.

^b Results of the analyses of clusters UK and Others are shown above in the table (Haplogroups section).

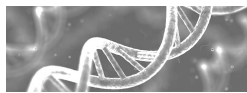


Table 2
Frequencies and odds ratios (ORs) of mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and clusters in OA patients and healthy controls from the UK cohort.

	Control	Knee OA	Total	OR	95% CI		Nominal p-value	Adjusted p-value
	(n = 280)	(n = 453)	(n = 733)		Lower CI	Upper CI		
<i>Haplogroups</i>								
H	116 (41.4)	186 (41.1)	302 (41.2)	0.985	0.728	1.333	0.921	1.000
J	16 (5.7)	42 (9.3)	58 (7.9)	1.686	0.929	3.061	0.083	0.415
T	40 (14.3)	40 (8.8)	80 (10.9)	0.581	0.365	0.926	0.021*	0.105
U ^a	75 (26.8)	116 (25.6)	191 (26.1)	0.941	0.671	1.320	0.724	1.000
Others	33 (11.8)	69 (15.2)	102 (13.9)	1.345	0.865	2.091	0.190	0.950
<i>Clusters^b</i>								
Cluster HV	131 (46.8)	218 (48.1)	349 (47.6)	1.055	0.783	1.422	0.725	1.000
Cluster TJ	56 (20)	82 (18.1)	138 (18.8)	0.884	0.606	1.290	0.523	1.000

Values are number of samples with percentage in parentheses.

OR = odds ratio.

CI = confidence interval.

* Statistical significance ($p < 0.05$) before Bonferroni correction.

^a The haplogroup U data include the K subgroup.

^b Results of the analyses of clusters UK and Others are shown above in the table (Haplogroups section).

univariate analysis did not reach statistical significance, haplogroup T was significantly associated with a lower probability of OA in the regression analysis, after adjusting for age and gender as potential negative confounders. A point that could be critiqued is that haplogroup T was compared with all other haplogroups pooled into one group; however, this was done in order to compare the results with other published ones.

Both haplogroups J and T have been described as sister haplogroups that share a common root (Ruiz-Pesini et al., 2004) and different studies support the idea that these two haplogroups are characterized by the presence of uncoupling mutations that, in combination with certain nuclear backgrounds, leads to a decreased ATP production (Castro et al., 2007; Ruiz-Pesini et al., 2000) and consequently to a reduced ROS generation (Kenney et al., 2014; Mishmar et al., 2003; Ruiz-Pesini et al., 2004; Wallace et al., 2003). The possible explanation for this population-specific association could arise from the fact that each of these two mtDNA variants could present an advantage to different environmental conditions, as described in other cases (Domínguez-Garrido et al., 2009). In the case of this study, the different environmental conditions could be related to the different climatic patterns that took place when these mtDNA haplogroups (J and T) entered Europe from the Near East at the beginning of the late glacial period, being the Franco-Cantabria area one of the main refugia for human migrations during the height of the last Ice Age (Pala et al., 2012; Richards et al., 1998). This is not a minor issue since a major set of migrations were from glacial refugia back into the northern regions of Europe, such as the UK (Pala et al., 2012).

The data showed in this work are not entirely in agreement with the, up to date, largest mtDNA association study carried out in 7393 OA cases

from the arcOGEN Consortium and 5122 asymptomatic controls from the Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (Hudson et al., 2013). However, as proposed by these authors, the relative contribution of specific mtDNA variants could vary in different ethnic groups, possibly through an interaction with environmental factors and different nuclear genes (Ruiz-Pesini et al., 2004), which would explain the no association of the haplogroup J. Besides, it must be taken into account that the controls of this study are asymptomatic controls and up to 50% of people without knee symptoms have radiographic signs of knee OA (Hannan et al., 2000).

In order to try to clarify the discrepancies regarding the haplogroup J between these populations, including the different frequencies of this mitochondrial variant between both control cohorts, we sequenced the whole mtDNA of 6 samples from the UK and 6 from Spain carrying the haplogroup J (J1c subtype) and, additionally, we also studied two of the most important SNPs of the haplogroup J, the m.14798t>c and m.15257g>a, since these two variants affect the coupling efficiency of the OXPHOS system (Wallace et al., 2003). As a result of the sequencing, differences in the frequency distribution of some haplogroup J-related SNPs were found between both populations (Supplementary Table 2) and, based on these results, we selected the SNP m.3394t>c for analysis because this polymorphism has also been implicated as a secondary mutation associated with LHON (Wallace, 1999). In relation to this SNP, some studies have analyzed its incidence in several diseases, like cardiac arrhythmia (Nikoskelainen et al., 1985), non-insulin dependent diabetes mellitus (Thomas et al., 1996), cardiomyopathy (Obayashi et al., 1992) or sudden infant death syndrome (Arnestad et al., 2007), all of them related with ATP deficiency; besides, this SNP has also been associated with lower O₂ consumption (Matsuoka et al., 1999). These two latter characteristics, lower ATP production and lower O₂ consumption, are typically related to the mtDNA haplogroup J (Marcuello et al., 2009; Martínez-Redondo et al., 2010; Mishmar et al., 2003), being the main cause of its protective effect on some degenerative and oxidative stress-related diseases (Rego-Perez et al., 2008; van der Walt et al., 2003) and its increased frequency in elderly people (Domínguez-Garrido et al., 2009; Gaweda-Walerych et al., 2008; Niemi et al., 2003).

Several authors, based on the analysis of mtDNA sequences, pointed to an important heterogeneity in the frequency distribution of the haplogroup J and their subtypes since their introduction in Europe (Alfonso-Sanchez et al., 2008; Logan, 2008; Pala et al., 2012; Richards et al., 1998), and this could explain, at least in part, the different genetic composition of this haplogroup between the UK and Spain and, consequently, its different behavior in both populations.

In summary, despite the original association described in the Spanish population was not replicated in the UK, the mtDNA haplogroup T appears to be a protective factor against OA in the UK cohort. This

Table 3
Logistic regression analysis in OA patients and healthy controls from Spain and UK.

Variables	B	OR	95% CI	p ^a
<i>Spanish cohort</i>				
Gender (male)	-0.344	0.709	0.568-0.884	0.002*
Age (years)	0.032	1.032	1.023-1.041	<0.001*
Haplogroup J	-0.453	0.636	0.444-0.911	0.013*
<i>UK cohort</i>				
Gender (male)	-1.200	0.301	0.218-0.416	<0.001*
Age (years)	0.050	1.051	1.027-1.075	<0.001*
Haplogroup T	-0.556	0.574	0.350-0.939	0.027*

B = regression coefficient.

OR = odds ratio.

CI = confidence interval.

^a p-Value from the logistic regression analysis.

* Statistical significance at $p \leq 0.05$.

Table 4

Frequencies of mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and clusters in healthy controls and OA patients between Spain and UK.

	Healthy controls (N = 686)				OA patients (N = 1924)			
	Spain	UK	Nominal p-value	Adjusted p-value	Spain	UK	Nominal p-value	Adjusted p-value
	(n = 406)	(n = 280)			(n = 1471)	(n = 453)		
Haplogroups								
H	179 (44.1)	116 (41.4)	0.489	1.000	661 (44.9)	186 (41.1)	0.146	0.730
J	46 (11.3)	16 (5.7)	0.012 ^a	0.060	107 (7.3)	42 (9.3)	0.164	0.820
T	42 (10.3)	40 (14.3)	0.118	0.590	130 (8.8)	40 (8.8)	0.996	1.000
U ^a	92 (22.7)	75 (26.8)	0.216	1.000	335 (22.8)	116 (25.6)	0.213	1.000
Others	47 (11.6)	33 (11.8)	0.933	1.000	238 (16.2)	69 (15.2)	0.630	1.000
Clusters^b								
Cluster HV	196 (48.3)	131 (46.8)	0.701	1.000	761 (51.7)	218 (48.1)	0.179	0.358
Cluster TJ	88 (21.7)	56 (20)	0.597	1.000	237 (16.1)	82 (18.1)	0.319	0.638

Values are number of samples with percentage in parentheses.

^a Statistical significance ($p < 0.05$) before Bonferroni correction.^a The haplogroup U data include the K subgroup.^b Results of the analyses of clusters UK and Others are shown above in the table (Haplogroups section).

haplogroup, together with the haplogroup J, is characterized by mitochondrial uncoupling mutations which, in combination with certain nuclear backgrounds, make this population-specific association related to the advantage of each of these two haplogroups to each of the two populations analyzed (UK and Spain). The different genetic composition of the mtDNA haplogroup J between the UK and Spain could be due to the ancestral heterogeneity of this haplogroup when introduced into Europe, resulting in differentially represented polymorphisms, like the SNP m.3394t>c. However, a larger cohort of UK and Spanish samples must be fully sequenced in order to validate this preliminary association and to analyze the frequency of more haplogroup J-related SNPs differentially expressed in both populations that permit us to explain the discrepancy of the haplogroup J in these two Caucasian populations.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.03.001>.

Authors' contributions

ASH carried out the experimental procedures of the mitochondrial haplogroup identification. He helped to draft the manuscript and he has given final approval of the version to be published. MFM performed the statistical analysis and carried out the sequencing of the differential J-related SNPs. NO and CFL collected the Spanish samples and checked clinical histories for the inclusion and exclusion criteria. IRP has been involved in the conception and design of the study, he helped to draft the manuscript and he has given final approval of the version to be published. He was also involved in the mitochondrial haplogroup identification and sequencing. FJB conceived the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Role of the funding source

The authors express appreciation to Lourdes Sanjurjo and Maria Dolores Velo and to the Department of Orthopaedic Surgery from the

Table 5

Frequency of mitochondrial DNA (mtDNA) SNPs m.14798t>c, m.15257g>a and m.3394t>c between haplogroup J carriers from UK and Spain.

mtDNA SNP	Spain (n = 149)	UK (n = 58)	Nominal p-value	Adjusted p-value
m.14798t>c	81 (54.4)	35 (60.3)	0.436	1.000
m.15257g>a	49 (32.9)	14 (24.1)	0.219	0.657
m.3394t>c	31 (20.8)	5 (8.6)	0.038 ^a	0.114

Values are number of samples with percentage in parentheses.

^a Statistical significant.

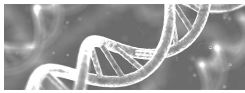
CHU A Coruña. This study was supported by grants from Fundación Española de Reumatología (programa GEN-SER) from the Fondo Investigación Sanitaria, Madrid, Spain (CIBER- CB06/01/0040; PI12/00329; RETIC-RIER-RD12/0009/0018; and Proteo-Red/ISCIII), Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, Xunta de Galicia (10 PXIB 310153 PR) and Red Gallega REDICENT (part of the Biomolecular and Bioinformatics Resources platform, PRB2-ISCIII, supported by grant PT13/0001 from Instituto de Salud Carlos III), with a contribution of funds from FEDER (European Community). IR-P was supported by Contrato Miguel Servet – Fondo Investigación Sanitaria (CP12/03192).

Acknowledgments

We are grateful to John Loughlin, from the Institute of Cellular Medicine of the University of Newcastle, for providing the samples from the UK.

References

- Alfonso-Sanchez, M.A., Cardoso, S., Martinez-Bouzas, C., Pena, J.A., Herrera, R.J., Castro, A., Fernández-Fernández, I., De Pancorbo, M.M., 2008. Mitochondrial DNA haplogroup diversity in Basques: a reassessment based on HV1 and HVII polymorphisms. *Am. J. Hum. Biol.* 20 (2), 154–164 (Mar-Apr).
- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T.D., Greenwald, R., Hochberg, M., 1986. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum.* 29 (8), 1039–1049 (Aug).
- Ambrose, S.H., 1998. Late Pleistocene human population bottlenecks, volcanic winter, and differentiation of modern humans. *J. Hum. Evol.* 34 (6), 623–651 (Jun).
- Arnestad, M., Opdal, S.H., Vege, A., Rognum, T.O., 2007. A mitochondrial DNA polymorphism associated with cardiac arrhythmia investigated in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr.* 96 (2), 206–210 (Feb).
- Blanco, F.J., Lopez-Armada, M.J., Maneiro, E., 2004. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* 715–728 (Netherlands).
- Blanco, F.J., Rego, I., Ruiz-Romero, C., 2011. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7 (3), 161–169.
- Brand, M.D., 2000. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* 35 (6–7), 811–820 (Sep).
- Castro, M.G., Terrados, N., Reguero, J.R., Alvarez, V., Coto, E., 2007. Mitochondrial haplogroup T is negatively associated with the status of elite endurance athlete. *Mitochondrion* 7 (5), 354–357 (Sep).
- Cillero-Pastor, B., Carames, B., Lires-Dean, M., Vaamonde-García, C., Blanco, F.J., Lopez-Armada, M.J., 2008. Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 58 (8), 2409–2419 (Aug).
- Dominguez-Garrido, E., Martínez-Redondo, D., Martín-Ruiz, C., Gómez-Durán, A., Ruiz-Pesini, E., Madero, P., Tamparillas, M., Montoya, J., von Zglinicki, T., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M.J., 2009. Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations. *Biogerontology* 10 (4), 435–442 (Aug).
- Felson, D.T., Zhang, Y., 1998. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum.* 41 (8), 1343–1355 (Aug).
- Fernández-Moreno, M., Tamayo, M., Soto-Hermida, A., Mosquera, A., Oreiro, N., Fernández-López, C., Fernández, J.L., Rego-Pérez, I., Blanco, F.J., 2011. mtDNA haplogroup J modulates telomere length and nitric oxide production. *BMC Musculoskelet. Disord.* 12, 283.



- Gaweda-Walerych, K., Maruszak, A., Safranow, K., Bialecka, M., Klodowska-Duda, G., Czyżewski, K., Slawek, J., Rudzinska, M., Styczynska, M., Opala, G., Drodzik, M., Canter, J.A., Barcikowska, M., Zekanowski, C., 2008. Mitochondrial DNA haplogroups and subhaplogroups are associated with Parkinson's disease risk in a Polish PD cohort. *J. Neural Transm.* 115 (11), 1521–1526 (Nov).
- Grishko, V.I., Ho, R., Wilson, G.L., Pearsall, A.W., 2009. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 17 (1), 107–113 (Jan).
- Hannan, M.T., Felson, D.T., Pincus, T., 2000. Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J. Rheumatol.* 27 (6), 1513–1517 (Jun).
- Henrotin, Y., Kurz, B., 2007. Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality? *Curr. Drug Targets* 8 (2), 347–357 (Feb).
- Hudson, G., Panoutsopoulou, K., Wilson, I., Southam, L., Rayner, N.W., Arden, N., Birrell, F., Carluke, I., Carr, A., Chapman, K., Deloukas, P., Doherty, M., McCaskie, A., Ollier, W.E., Ralston, S.H., Reed, M.R., Spector, T.D., Valdes, A.M., Wallis, G.A., Wilkinson, J.M., Zeggini, E., Samuels, D.C., Loughlin, J., Chinnery, P.F., rOGEN Consortium, 2013. No evidence of an association between mitochondrial DNA variants and osteoarthritis in 7393 cases and 5122 controls. *Ann. Rheum. Dis.* 72 (1), 136–139 (Jan).
- Kellgren, J.H., Lawrence, J.S., 1957. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 16 (4), 494–502 (Dec).
- Kenney, M.C., Chwa, M., Atlano, S.R., Falatoonzadeh, P., Ramirez, C., Malik, D., Tarek, M., Del Carpio, J.C., Nesburn, A.B., Boyer, D.S., Kuppermann, B.D., Vawter, M.P., Jazwinski, S.M., Miceli, M.V., Wallace, D.C., Udar, N., 2014. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2), 208–219 (Feb).
- Kim, H.A., Blanco, F.J., 2007. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr. Drug Targets* 8 (2), 333–345 (Feb).
- Logan, J., 2008. The Subclades of mtDNA Haplogroup J and Proposed Motifs for Assigning Control-Region Sequences into These Clades. 12–26.
- Macaulay, V., Richards, M., Hickey, E., Vega, E., Cruciani, F., Guida, V., Scozzari, R., Bonnè-Tamir, B., Sykes, B., Torroni, A., 1999. The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1), 232–249 (Jan).
- Maneiro, E., Martín, M.A., de Andres, M.C., Lopez-Armada, M.J., Fernandez-Sueiro, J.L., del Hoyo, P., Galdo, F., Arenas, J., Blanco, F.J., 2003. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 48 (3), 700–708 (Mar).
- Marcuello, A., Martínez-Redondo, D., Dahmani, Y., Casajus, J.A., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., López-Pérez, M.J., Díez-Sánchez, C., 2009. Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion* 9 (1), 27–30 (Feb).
- Martínez-Redondo, D., Marcuello, A., Casajús, J.A., Ara, I., Dahmani, Y., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E., López-Pérez, M.J., Díez-Sánchez, C., 2010. Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO_{2max} consumer—is it a paradox? *Mitochondrion* 10 (2), 102–107 (Mar).
- Matsuoka, R., Furutani, M., Hayashi, J., Isebe, K., Akimoto, K., Shibata, T., Imamura, S., Tatsuguchi, M., Furutani, Y., Takao, A., Ohnishi, S., Kasanuki, H., Momma, K., 1999. A mitochondrial DNA mutation cosegregates with the pathophysiological U wave. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 (1), 228–233 (Apr).
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A.G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D., Sukernik, R.I., Olckers, A., Wallace, D.C., 2003. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 171–176 (United States).
- Nieminen, A.K., Hervonen, A., Hurme, M., Karhunen, P.J., Jylha, M., Majamaa, K., 2003. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum. Genet.* 112 (1), 29–33 (Jan).
- Nikoskelainen, E., Wanne, O., Dahl, M., 1985. Pre-excitation syndrome and Leber's hereditary optic neuropathy. *Lancet* 1 (8430), 696 (Mar).
- Obayashi, T., Hattori, K., Sugiyama, S., Tanaka, M., Tanaka, T., Itoyama, S., Deguchi, H., Kawamura, K., Koga, Y., Toshima, H., 1992. Point mutations in mitochondrial DNA in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 124 (5), 1263–1269 (Nov).
- Pala, M., Olivieri, A., Achilli, A., Accetturo, M., Metspalu, E., Reidla, M., Tamm, E., Karmin, M., Reisberg, T., Hooshjar Kashani, B., Perego, U.A., Carossa, V., Gandini, F., Pereira, J. B., Soares, P., Angerhofer, N., Rychkov, S., Al-Zahery, N., Carelli, V., Sanati, M.H., Houshmand, M., Hatina, J., Macaulay, V., Pereira, L., Woodward, S.R., Davies, W., Gamble, C., Baird, D., Semino, O., Villems, R., Torroni, A., Richards, M.B., 2012. Mitochondrial DNA signals of late glacial recolonization of Europe from near eastern refugia. *Am. J. Hum. Genet.* 90 (5), 915–924 (May).
- Rego, I., Fernández-Moreno, M., Fernández-López, C., Gómez-Reino, J.J., González, A., Arenas, J., Blanco, F.J., 2010. Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Ann. Rheum. Dis.* 69 (1), 210–213 (Jan).
- Rego-Perez, I., Fernández-Moreno, M., Fernández-Lopez, C., Arenas, J., Blanco, F.J., 2008. Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 58 (8), 2387–2396 (Aug).
- Rego-Pérez, I., Fernández-Moreno, M., Deberg, M., Perteiga, S., Fernández-López, C., Oreiro, N., Henrotin, Y., Blanco, F.J., 2010. Mitochondrial DNA haplogroups modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 69 (5), 910–917 (May).
- Rego-Perez, I., Fernandez-Moreno, M., Deberg, M., Perteiga, S., Fernandez-Lopez, C., Oreiro, N., Henrotin, Y., Blanco, F.J., 2011. Mitochondrial DNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 646–652 (England).
- Richards, M.B., Macaulay, V.A., Bandelt, H.J., Sykes, B.C., 1998. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann. Hum. Genet.* 62 (Pt 3), 241–260 (May).
- 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., Enriquez, J.A., 2000. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am. J. Hum. Genet.* 67 (3), 682–696 (Sep).
- Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V., Wallace, D.C., 2004. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303 (5655), 223–226 (Jan).
- Southam, L., Rodríguez-Lopez, J., Wilkins, J.M., Pombo-Suarez, M., Snelling, S., Gomez-Reino, J.J., Chapman, K., Gonzalez, A., Loughlin, J., 2007. An SNP in the 5'-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in allelic expression in articular cartilage. *Hum. Mol. Genet.* 16 (18), 2226–2232 (Sep).
- Southam, L., Panoutsopoulou, K., Rayner, N.W., Chapman, K., Durrant, C., Ferreira, T., Arden, N., Carr, A., Deloukas, P., Doherty, M., Loughlin, J., McCaskie, A., Ollier, W.E., Ralston, S., Spector, T.D., Valdes, A.M., Wallis, G.A., Wilkinson, J.M., arcOGEN consortium, Marchini, J., Zeggini, E., 2011. The effect of genome-wide association scan quality control on imputation outcome for common variants. *Eur. J. Hum. Genet.* 19 (5), 610–614 (May).
- Terkeltaub, R., Johnson, K., Murphy, A., Ghosh, S., 2002. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion* 1 (4), 301–319 (Feb).
- Thomas, A.W., Edwards, A., Sherratt, E.J., Majid, A., Gagg, J., Alcolado, J.C., 1996. Molecular scanning of candidate mitochondrial tRNA genes in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *J. Med. Genet.* 33 (3), 253–255 (Mar).
- Torroni, A., Huoponen, K., Francalacci, P., Petrozzi, M., Morelli, L., Scozzari, R., Obinì, D., Savontaus, M.L., Wallace, D.C., 1996. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144 (4), 1835–1850 (Dec).
- Valdes, A.M., Spector, T.D., 2011. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 23–32 (United States).
- van der Walt, J.M., Nicodemus, K.K., Martin, E.R., Scott, W.K., Nance, M.A., Watts, R.L., Hubble, J.P., Haines, J.L., Koller, W.C., Lyons, K., Pahwa, R., Stern, M.B., Colcher, A., Hiner, B.C., Jankovic, J., Ondo, W.G., Allen Jr, F.H., Goetz, C.G., Small, G.W., Mastaglia, F., Stajich, J.M., McLaurin, A.C., Middleton, L.T., Scott, B.L., Schmechel, D.E., Pericak-Vance, M.A., Vance, J.M., 2003. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* 72 (4), 804–811 (Apr).
- Wallace, D.C., 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283 (5407), 1482–1488 (Mar).
- Wallace, D.C., Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., 2003. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 68, 479–486.

3.2 CAPÍTULO 2:

“Mitochondrial DNA haplogroups modulate the radiographic progression of Spanish patients with osteoarthritis”

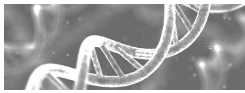
Resumen capítulo 2: *Mitochondrial DNA haplogroups modulate the radiographic progression of Spanish patients with osteoarthritis.*

La artrosis es una de las principales causas de discapacidad en las sociedades avanzadas. Acarrea unos elevados costes económicos para la sociedad además de provocar un notable deterioro en la calidad de vida de los pacientes que la sufren. Es una enfermedad de origen multifactorial en la que interactúan factores ambientales y genéticos. Existe un creciente número de evidencias que ponen de manifiesto el papel de la mitocondria en el desarrollo de la enfermedad. A esto hay que añadir que, desde el punto de vista genético, se han encontrado evidencias de que las variantes genéticas del ADNmt influyen en la patología. De este modo se ha relacionado la presencia de polimorfismo específicos, que conforman los haplogrupos mitocondriales, con el menor riesgo de padecer artrosis tanto en población de raza caucásica como en población de raza asiática.

No todos los pacientes que padecen artrosis evolucionan de la misma manera, algunos pacientes presentan una progresión lenta de la enfermedad manteniéndose estables en el tiempo mientras que otros pacientes progresan muy rápido y en pocos años acaban siendo sometidos a cirugía de implantación de prótesis articular. El uso de biomarcadores genéticos y/o proteicos en la artrosis, no solo como marcadores de riesgo de la misma sino también como herramientas de predicción para identificar pacientes en riesgo de progresar más rápidamente en la enfermedad, es uno de los retos de la investigación en la actualidad ya que los trabajos que han evaluado el papel de los factores genéticos en la progresión de la artrosis no se han podido replicar.

Con estos antecedentes nos planteamos como objetivo de este trabajo evaluar el papel de los haplogrupos mitocondriales en la progresión radiográfica de los pacientes artrósicos.

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó una cohorte retrospectiva de pacientes con artrosis de rodilla y/o cadera, según los criterios de la ACR, pertenecientes al Hospital Universitario de A Coruña. El periodo de seguimiento nunca fue inferior a 36 meses entre dos radiografías incluyéndose



en el estudio sólo aquellos pacientes con un grado *KL* comprendido entre I y III en la primera radiografía. El criterio de progresión radiográfica consistió en el incremento de al menos un grado *KL* durante el periodo de seguimiento. Para asignar los grados *KL* y evaluar los cambios estructurales de la articulación en estudio las radiografías fueron visualizadas por personal clínico cualificado para dichas tareas desconociendo además la información clínica asociada a la imagen radiográfica.

La asignación de los haplogrupos mitocondriales se realizó a partir de muestras de ADN total sometidas a una *PCR* convencional en donde se amplifican los fragmentos que contienen los polimorfismos discriminatorios que permiten identificar los 6 haplogrupos europeos más representativos. Posteriormente, una vez purificados los fragmentos de *PCR*, se sometieron a una reacción de *SBE* antes de cargarlos en el secuenciador automático de ADN para su análisis. Los haplogrupos Europeos menos comunes se asignaron mediante la técnica de *RFLP*.

Debido a que algunos haplogrupos presentan una frecuencia baja en la población y con el objeto de realizar estudios más robustos desde el punto de vista estadístico, los análisis se realizaron de acuerdo a:

- 1- los clúster mitocondriales: englobando a aquellos haplogrupos que presentan un origen filogenético común (HV, KU, TJ y Otros).
- 2- los portadores del haplogrupo H frente a los no-H, ya que es el haplogrupo Europeo mayoritario y presenta claras diferencias metabólicas en relación al resto de haplogrupos

Los resultados obtenidos mostraron que la probabilidad acumulada de progresión radiográfica fue de un 33.2% para un periodo de 5 años mientras que este porcentaje se incrementa hasta un 78.2% en un periodo de 10 años. En el caso de los pacientes que progresaron hasta una prótesis los porcentajes obtenidos de probabilidad acumulada fueron de un 18.9% y de un 54.4% para los periodos de 5 y 10 años respectivamente.

Para evaluar la influencia de los haplogrupos sobre la progresión en la artrosis se realizaron curvas de supervivencia Kaplan-Meier y modelos de regresión de Cox ajustados por edad, sexo y BMI (del inglés *body mass index*).

Estos análisis mostraron que los pacientes pertenecientes al clúster TJ presentaron una progresión en artrosis significativamente más lenta que los pacientes pertenecientes al clúster Uk. No se encontró ninguna asociación entre clúster con respecto a la progresión a prótesis. Cuando comparamos a los portadores del haplogrupo H frente a los que no lo son se observó que existe una tendencia no significativa hacia una progresión más rápida en la enfermedad para los primeros. Sin embargo, esta relación sí es estadísticamente significativa en el caso de la progresión a prótesis. Además se obtuvo que los hombres son los que presentan mayor probabilidad de alcanzar la prótesis, tanto en el modelo por clústeres como en el de pertenencia al haplogrupo H o no.

Mitochondrial DNA haplogroups modulate the radiographic progression of Spanish patients with osteoarthritis

Angel Soto-Hermida · Mercedes Fernández-Moreno · Sonia Pértega-Díaz ·
Natividad Oreiro · Carlos Fernández-López · Francisco J. Blanco ·
Ignacio Rego-Pérez

Received: 16 April 2014 / Accepted: 21 July 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Not all patients with osteoarthritis (OA) show the same disease progression, as some of them remain relatively stable over time, while others progress to severe structural deterioration of the joint. In this sense, the main goal of both genetic and protein biomarkers in OA is to predict not only the risk of OA at an earlier stage of the disease but also which OA patients are more likely to progress to severe disease. Taking into account the incidence of the mitochondria and the mtDNA haplogroups in the pathogenesis of OA, the main objective of this work was to evaluate the incidence of the mtDNA haplogroups in the radiographic progression of the OA disease in a well-characterized follow-up cohort of Spanish patients. DNA from 281 OA patients from Hospital Universitario A Coruña was isolated to determine the European mtDNA haplogroups.

Knee or hip radiographs from all affected joints were obtained at two time points with at least 36 months apart. Radiographs were evaluated using the Kellgren/Lawrence (K/L) scale; radiographic OA progression was defined as any radiographic worsening of the K/L joint score. Statistical analyses included Kaplan–Meier survival curves and Cox regression models. Patients belonging to the cluster TJ showed a slower radiographic OA progression than patients in the cluster KU ($p = 0.036$). Moreover, patients carrying the most common mtDNA haplogroup H are more apt to require total joint replacement surgery than non-H patients ($p = 0.049$). The inherited mitochondrial variants influence the radiographic progression of OA and could be considered among the genetic variants taken into account when the radiographic progression of OA is analyzed.

Keywords Mitochondria · Haplogroups · Osteoarthritis · Cartilage · Progression · K/L grade

A. Soto-Hermida · M. Fernández-Moreno · S. Pértega-Díaz ·
N. Oreiro · C. Fernández-López · F. J. Blanco (✉) ·
I. Rego-Pérez (✉)

Grupo de Genómica, Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas, Universidade da Coruña (UDC), As Xubias, 15006 A Coruña, España, Spain
e-mail: fblagar@sergas.es

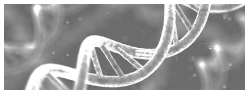
I. Rego-Pérez
e-mail: ignacio.rego.perez@sergas.es

S. Pértega-Díaz
Unidad de Epidemiología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas, As Xubias, 15006 A Coruña, Spain

F. J. Blanco
CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Valencia, Spain

Abbreviations

ABI	Applied biosystems
ACR	American college of Rheumatology
ATP	Adenosine triphosphate
BMI	Body mass index
CI	Confidence interval
CILP	Cartilage intermediate layer protein
DNA	Deoxyribonucleic acid
GDF5	Growth differentiation factor 5
HR	Hazard ratio
IL1RN	Interleukin-1 receptor antagonist
JSW	Joint space width
KL	Kellgren and Lawrence
MRC	Mitochondrial respiratory chain
mtDNA	Mitochondrial deoxyribonucleic acid
OA	Osteoarthritis



OAI	Osteoarthritis initiative
OR	Odds ratio
OXHPOS	Oxidative phosphorylation system
PCR	Polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
ROS	Reactive oxygen species
SBE	Single base extension
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPSS	Statistical package for the social sciences

Introduction

Osteoarthritis (OA), the most common joint disease related to aging, is characterized by the degeneration of articular cartilage, which affects subchondral bone and soft tissue and leads to joint destruction and severe impairment of mobility [1]. OA is also the leading cause of permanent work incapacitation and one of the most common reasons for visiting primary care physicians. OA is a multifactorial disease in which a combination of both environmental and genetic factors interacts [2].

Even with the glycolytic nature of articular chondrocytes, a growing body of evidence suggests that mitochondria mediate the pathogenesis of OA [3]. Mitochondrial function is altered in OA chondrocytes [4], and the apoptotic mitochondrial pathway is one of the major cellular pathways for apoptosis of OA chondrocytes [5]. The inhibition of complexes III and V of the mitochondrial respiratory chain (MRC) causes an increased inflammatory response potentially related to the production of reactive oxygen species (ROS) [6]. Furthermore, mitochondrial free radical production compromises chondrocyte function [7, 8], causing mtDNA damage and reduced mtDNA capacity for repair [9]. The mtDNA haplogroups, defined as individual groups characterized by the presence of a particular set of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the mtDNA sequence [10], have been shown to be related to OA not only in Spanish and UK populations, in which mtDNA haplogroups belonging to the cluster TJ have been associated with a decreased risk of OA [11–13], but also in southern Chinese populations [14]. These mitochondrial variants also influence serum levels of classical collagen type II molecular biomarkers [15] and proteolytic enzymes [16], making them potential complementary candidates for biomarkers of OA.

It is established that all OA patients do not progress in the same way; some patients remain relatively stable over time, while others progress more rapidly to severe structural deterioration often leading to joint replacement. The usefulness of both genetic and protein biomarkers in OA is to predict not only the risk of OA at an earlier stage of the disease [17] but also which OA patients are more likely to

progress to severe disease. Some studies have evaluated the role of genetic factors in the severity or progression of OA [11, 18–20]; however, these genetic associations have not been replicated, and to date, relatively little is known about risk factors for radiographic OA progression despite their great clinical importance.

In consideration of this background and the discovery of the role of mitochondria in the pathogenesis of OA, the objective of this study was to evaluate the occurrence of different mtDNA haplogroups in the radiographic progression of OA using a well-characterized follow-up population of Spanish patients.

Materials and methods

Sample population

The characteristics of the study population are shown in Table 1. This follow-up cohort consisted of 281 patients from Hospital Universitario A Coruña with knee or hip OA diagnosed according to American college of Rheumatology (ACR) criteria [21]. This cohort was already used and described in detail in previous studies [11, 12]. The follow-up period was not <36 months between two radiographs. For this study, only those OA patients with a maximum K/L grade between I and III in either the knee or hip on the first radiograph were selected. In all cases, informed consent and the agreement of the ethical committee from Galician Health Administration were obtained.

mtDNA haplogroups genotyping

The mtDNA haplogroups of all OA patients were assessed following DNA isolation using a previously described assay [11]. Briefly, a multiplex polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify six mtDNA fragments that contain each of the informative SNPs that characterize seven common European mtDNA haplogroups (*H*, *V*, *HV**, *U*, *K*, *J* and *T*). The resulting PCR fragments were further purified and analyzed by the single base extension (SBE) assay, and the informative SNPs were visualized after loading the purified SBE product into an ABI 3130 XL genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States). The less common haplogroups (*W*, *I*, *X* and others) were assessed by means of PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) according to the hierarchical scheme described in the above-mentioned study.

Radiographic progression criteria

Radiographic progression was defined as any radiographic worsening of the hip or knee K/L score in a follow-up

Table 1 Characteristics of the study population grouped by mitochondrial DNA (mtDNA) clusters and mtDNA haplogroup H

Characteristic	mtDNA clusters				mtDNA haplogroup H			Total (N = 281)	
	HV (N = 146)	KU (N = 64)	TJ (N = 41)	Others (N = 30) p	H (N = 133)	Non-H (N = 148)	p		
Samples per haplogroup	H = 133 V = 7 HV* = 6	K = 25 U = 39	T = 21 J = 20	X = 13 W = 3 Others = 14					
Age at baseline (years)	62.77 ± 9.75	60.72 ± 9.32	63.17 ± 10.17	63.93 ± 8.86	0.315*	62.90 ± 9.97	62.11 ± 9.33	0.515*	62.49 ± 9.63
Gender					0.150 [#]			0.254 [#]	
Male	29 (19.9)	17 (26.6)	13 (31.7)	11 (36.7)		29 (21.8)	41 (27.7)		70 (24.9)
Female	117 (80.1)	47 (73.4)	28 (68.3)	19 (63.3)		104 (78.2)	107 (72.3)		211 (75.1)
BMI (Kg/m ²)	31.81 ± 5.58	31.65 ± 4.85	30.11 ± 3.97	31.84 ± 4.33	0.326*	31.79 ± 5.76	31.29 ± 4.42	0.634*	31.53 ± 5.09
BMI ≤ 30	61 (41.8)	27 (42.2)	21 (51.2)	13 (43.3)	0.750 [#]	57 (42.9)	65 (43.9)	0.858 [#]	122 (43.4)
BMI > 30	85 (58.2)	37 (57.8)	20 (48.8)	17 (56.7)		76 (57.1)	83 (56.1)		159 (56.6)
Initial K/L grade:					0.249 [#]			0.115 [#]	
I	39 (26.7)	21 (32.8)	20 (48.8)	11 (36.7)		35 (26.3)	56 (37.8)		91 (32.4)
II	52 (35.6)	19 (29.7)	10 (24.4)	10 (33.3)		46 (34.6)	45 (30.4)		91 (32.4)
III	55 (37.7)	24 (37.5)	11 (26.8)	9 (30.0)		52 (39.1)	47 (31.8)		99 (35.2)

Values are number of patients with percentage in parentheses

* Kruskal–Wallis nonparametric test for comparison between mtDNA clusters, and Mann–Whitney nonparametric *U* test for comparison between carriers of haplogroup H and non-H carriers

[#] Chi-square test; BMI = body mass index; K/L = Kellgen/Lawrence grade

period of not <36 months between radiographs, using the date of the second radiograph in which radiographic progression was firstly detected. These radiographs were read by examiners blinded to the clinical information of the patients. Radiographic data consisted in fixed flexion knee radiographs and standing bilateral radiograph of the pelvis. If total knee or hip replacement was reached during the follow-up period, this was recorded and considered as an outcome.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS software, release 19 (Manufacturer, Chicago, IL, USA). Because some of the mtDNA haplogroups show a very low frequency in the population and in order to obtain an adequate sample size to achieve a confident statistical approach, the subsequent analyses were performed according to (1) mtDNA clusters that included pooled mtDNA haplogroups sharing a common root (HV, KU, TJ and others) and (2) mtDNA haplogroup H carriers versus non-H carriers, since this haplogroup is, on the one hand, the most common European mtDNA haplogroup and, on the other hand, also considered to show energetic behavior differing from the rest of haplogroups.

Analyzing radiographic progression, a 20 % of censored observations were detected in the study sample. With this percentage of censored observations, an α -level of 0.05 and a power of 0.80, the sample size of this study (*N* = 281) is enough to allow us to detect a hazard ratio (HR) of $HR \geq 1.7$, assuming a prevalence of a risk factor of 15 %. This is the approximated prevalence of the less frequent (TJ) of the mtDNA clusters studied.

On the other hand, when considering total joint replacement, a 54 % of censored observations were detected. With this percentage, an α -level of 0.05 and a power of 0.80, the sample size of this study (*N* = 281) is also enough to allow us to detect a hazard ratio (HR) of $HR \geq 2.0$, assuming a prevalence of a risk factor of 15 %. Since the prevalence of mtDNA haplogroup H is 47.3 %, this sample size allows us to reach an statistical power of 97 % to detect a HR of the same magnitude and even a statistical power of 48 % to detect $HR \geq 1.4$.

Kaplan–Meier survival curves and Cox regression models including other confounder variables such as gender, age and body mass index (BMI) greater or <30 kg/m² were performed, and the respective hazard ratios (HR) and confidence interval (CI) were calculated. In the Cox regression model that analyzes the influence of mtDNA clusters on radiographic OA progression, “mtDNA cluster” was

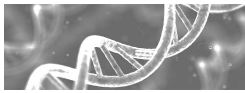


Table 2 Multivariate Cox regression analysis of radiographic osteoarthritis (OA) progression

Variables	<i>B</i>	HR	95 % CI	<i>p</i> ^c
Radiographic OA progression analyzed by mtDNA clusters				
Gender (male)	0.044	1.045	0.747–1.463	0.796
Age (years)	0.039	1.040	1.023–1.056	<0.001*
BMI (>30 kg/m ²)	0.031	1.032	0.772–1.380	0.832
mtDNA clusters				
HV versus TJ	0.230	1.258	0.794–1.993	0.328
KU versus TJ	0.537	1.711	1.037–2.823	0.036*
Others [#] versus TJ	0.181	1.199	0.678–2.118	0.533
Radiographic OA progression analyzed by carriers of mtDNA haplogroup H versus non-H				
Gender (male)	0.057	1.059	0.757–1.480	0.738
Age (years)	0.036	1.037	1.021–1.053	<0.001*
BMI (>30 kg/m ²)	0.071	1.074	0.807–1.429	0.626
Haplogroup H versus non-H	0.149	1.161	0.881–1.529	0.289

B regression coefficient, *HR* hazard ratio, *CI* confidence interval, *BMI* body mass index
 * Statistical significance at $p \leq 0.05$
[#] This group includes both minor European haplogroups *I*, *W*, *X* and non-European
^c *p* value from the Cox regression model

included as a categorical variable, considering the TJ cluster as the reference group. Therefore, the rest of the clusters (HV, KU and others) were subsequently compared with this reference group (TJ).

Results

Of the 281 OA patients in this study, 211 were females and 70 were males, with a mean age at baseline of 62.49 ± 9.63 years (range 42–85) and a mean BMI of 31.53 ± 5.09 kg/m² (range 19.65–49.38) (Table 1). Based on the estimations from this study, the accumulated probability of radiographic OA progression at 5 years in these patients was 33.2 %, meanwhile the same probability at 10 years was 78.2 %. Regarding those OA patients who reached total joint replacement, the accumulated probability at 5 years was 18.9 %; meanwhile, the same probability at 10 years was 54.4 %. The influence of mtDNA haplogroups on OA progression in this population was analyzed using Kaplan–Meier survival curves and Cox regression models adjusted for gender, age at baseline and BMI. The characteristics at baseline of the study population did not differ statistically between the different clusters analyzed or between carriers and non-carriers of mtDNA haplogroup H (Table 1).

We first analyzed the disease progression in patients belonging to mtDNA clusters HV, KU, TJ as well as the group called “others”, which includes minor European mtDNA haplogroups like *W*, *X* or *I*. The results of this analysis showed that OA patients in cluster TJ had significantly slower OA progression than those in cluster KU (HR = 1.711; 95 % CI 1.037–2.823; $p = 0.036$) (Table 2; Fig. 1). On the contrary, none of these mtDNA clusters significantly influenced the progression that reached total joint replacement (Table 3).

When comparing carriers of the most common European mtDNA haplogroup H to non-H carriers, the results showed that carriers of haplogroup H showed a nonsignificant trend toward faster OA progression than non-H carriers (HR = 1.161; 95 % CI 0.881–1.529; $p = 0.289$). This difference became statistically significant (Log rank Mantel Cox $p = 0.014$) when data from patients whose progression reached total joint replacement were analyzed. The statistical significance was maintained after adjusting for the confounding variables in the Cox regression model (HR = 1.441; 95 % CI 1.002–2.073; $p = 0.049$) (Table 3; Fig. 2).

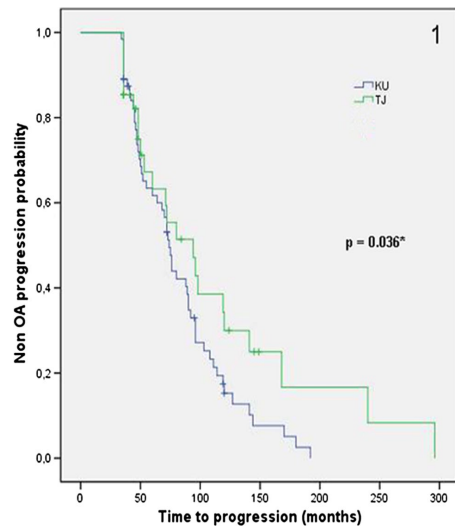


Fig. 1 Kaplan–Meier survival curves for the radiographic progression of osteoarthritis (OA) showing the influence of mitochondrial clusters TJ and KU. (*) Cox regression analysis

Table 3 Multivariate Cox regression analysis in patients who reached total joint replacement

Variables	<i>B</i>	HR	95 % CI	<i>p</i> ^c
Analysis by mtDNA clusters				
Gender (male)	0.426	1.530	1.020–2.296	0.040*
Age (years)	0.060	1.062	1.039–1.085	<0.001*
BMI (>30 kg/m ²)	0.043	1.044	0.715–1.525	0.823
mtDNA clusters				0.796
HV versus TJ	0.278	1.320	0.739–2.357	0.348
KU versus TJ	0.276	1.318	0.682–2.548	0.412
Others [#] versus TJ	0.130	1.139	0.553–2.344	0.725
Analysis of mtDNA haplogroup H versus non-H				
Gender (male)	0.408	1.504	1.004–2.252	0.048*
Age (years)	0.058	1.060	1.037–1.082	<0.001*
BMI (>30 kg/m ²)	0.056	1.057	0.728–1.534	0.770
Haplogroup H versus non-H	0.366	1.441	1.002–2.073	0.049*

B regression coefficient, *HR* hazard ratio, *CI* confidence interval, *BMI* body mass index

* Statistical significance declared at $p \leq 0.05$

[#] This group includes both minor European haplogroups *I*, *W*, *X* and non-European

^c *p* value from the Cox regression model

Additionally, both regression models based on mtDNA clusters and haplogroup H also revealed that males are more apt to require total joint replacement faster than females (HR = 1.530; 95 % CI 1.020–2.296; $p = 0.040$ and HR = 1.504; 95 % CI 1.004–2.252; $p = 0.048$ respectively) (Table 3).

Discussion

In this study, increases in K/L scores were used to determine the influence of mtDNA haplogroups on radiographic OA progression in a follow-up cohort of 281 OA patients from the Hospital Universitario A Coruña; total joint replacement was recorded and considered as an outcome. The use of the K/L score to ascertain the OA progression is not new, and this trait has been previously used in other studies [22]. The follow-up period of at least 36 months is also in agreement with previous works where the radiographic progression of OA was also assessed [23, 24].

In order to compensate for the low frequency of some mtDNA haplogroups in European populations [10], the analyses were performed attending to mtDNA clusters as well as carriers or not of haplogroup H. The comparison between carriers and non-carriers of haplogroup H allowed us to examine the effects of the most common mtDNA haplogroup, which has shown behavior differing from the other haplogroups in several studies [15, 25, 26]. Otherwise, because of the identical relation found by our group between mtDNA haplogroups and both knee and hip OA in two independent studies [11, 12], we pooled knee and hip samples to perform the statistical analyses.

In order to minimize information bias with a blinded evaluation of the radiographs to determine OA progression, radiographs were read by examiners blinded to the clinical

information of the patients. Besides, to control for possible confusion bias, we performed a multiple Cox regression analysis that permitted us to analyze the influence of mtDNA haplogroups on radiographic OA progression probability in the follow-up, after adjusting for other non-genetic risk factors, such as age, gender and BMI.

Our results show that mtDNA haplogroups influence radiographic OA progression. Patients belonging to cluster TJ had a slower OA progression than patients in cluster KU, and patients with mtDNA haplogroup H also showed not only a trend toward a faster OA progression than non-H carriers but also were more apt to require joint replacement surgery than non-H carriers. These results agree with earlier findings in which OA carriers of haplogroup H show higher serum levels of some catabolic OA-related biomarkers than did the other haplogroups [15, 16]. Because this study only evaluates OA patients to analyze the radiographic progression of the OA disease, we cannot conclude that carriers of mtDNA haplogroup H are more likely to get OA in the first place than carriers of the rest of haplogroups; however, attending to the results of our previous works, the frequency distribution of this haplogroup between OA patients and healthy controls is not significantly different [11, 12]. This indicates that when OA develops, it has a faster progression than in the rest of haplogroups, leading to a faster joint replacement surgery in carriers of haplogroup H.

An explanation for these findings must take into account the important biochemical differences that haplogroup H has from the other mtDNA haplogroups [26]. This haplogroup shows a high level of conserved aminoacids and, probably due to this, it has the strongest oxidative phosphorylation system (OXPHOS) coupling efficiency and ATP production [27–29]. Additionally, some authors reported that this haplogroup is also the highest oxygen uptake consumer [25]; however, this latter observation was not replicated in a very recent study by Larsen and colleagues

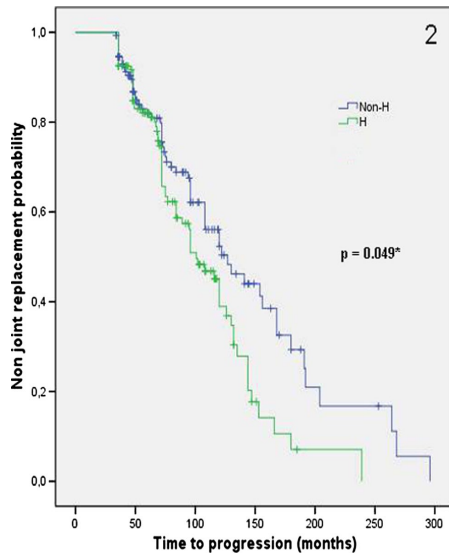
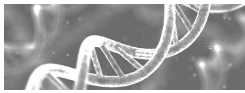


Fig. 2 Kaplan–Meier survival curves for the radiographic progression of osteoarthritis (OA) in patients who reached total joint replacement showing the influence of mtDNA haplogroup H. (*) Cox regression analysis

[30] probably due to the fact that maximal oxygen uptake is influenced by many other factors, not controlled in the previous study. Nevertheless, these features are accompanied by an augmented production of ROS, increased cellular damage and apoptosis [28, 31]. Because ROS production is one of the most important factors involved in OA [8], the high levels of ROS production found in haplogroup H may be the reason why carriers of this haplogroup are more likely to have a faster radiographic OA progression that rapidly leads to joint replacement.

Conversely, mtDNA haplogroups J and T (cluster TJ) show clear biochemical differences with haplogroup H [32], having minimal OXPHOS coupling efficiency, ATP production and oxygen uptake, which is accompanied by lower ROS production [28, 29, 33]. Additionally, the haplogroup T shows higher capacity to cope with oxidative stress than haplogroup H [33]. These characteristics would render patients in cluster TJ not only to be less prone to develop knee OA [11] but also to show slower OA progression.

The results of this work, as well as previous studies involving the mtDNA haplogroups in the context of the OA disease, contrast with a recent work by Hudson and co-workers in which they found no evidence of an association between mtDNA variants and OA [34]. However, some points could explain this discrepancy; first, control samples from the arcOGEN cohort are only asymptomatic

with no radiographic information; second, as postulated by the authors, the relative contribution of specific mtDNA variants could vary in different ethnic groups by means of homoplasmy and/or geographic differences in the finer details of sub-haplogroup structures of mtDNA [34]; third, as the authors describe in their manuscript, the GWAS study performed by the arcOGEN consortium also failed to replicate previous associations involving other genes described in OA at genome-wide significance levels, such as GDF5, chromosome 7q22 and MCF2L [35].

A key part of the variation in the different clinical forms of OA is attributable to genetics [36]. The results obtained in this work strengthen the role of genetic variation, including mitochondrial genetics, in OA as previously described [2, 3]. However, up to date, little is known about the incidence of genetic factors in the progression of OA. Previous studies by other investigators show that genetic variants of genes like interleukin-1 receptor antagonist (IL1RN) [20, 37] or cartilage intermediate layer protein (CILP), among others [18], influence the severity and progression of OA. Specifically, a functional polymorphism in the 5'-UTR of the growth differentiation factor-5 (GDF-5) gene has been consistently associated with OA susceptibility and also took part of a prediction model for knee OA based on genetic and clinical information [38, 39]. In summary, experimental data suggest that a combination of genetic variants from several loci can result in much larger odds ratios (OR) [39, 40]; this could improve identification of patients at high risk of OA, as well as OA patients predisposed to faster progression of the disease.

This study has some points that need to be clarified. First, this study includes patients diagnosed with knee or hip OA of which there are at least two radiographs in an interval of time not <36 months; therefore, OA patients with only one radiograph are not included, thus excluding to those patients of which the monitoring is not available due to several reasons (address change, decease, monitoring by private specialists, etc.). This bias could lead to an overestimation of the incidence of the OA progression in the monitoring of patients. Second, the increase in K/L score could have occurred at any moment between two consecutive radiographs, which could lead to an overestimation of the time needed for radiographic progression to occur. Finally, despite radiographic OA is normally defined as $K/L \geq 2$, in this study, we included people with $K/L = 1$ at baseline; however, the distribution of the initial K/L scores among all the groups analyzed was similar. Notwithstanding, these biases should equally affect all haplogroups, so the differences found in this study should correspond to real differences in radiographic OA progression probability among haplogroups, regardless of the accuracy of the OA progression estimates.

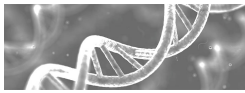
To summarize, the objective of this study was to analyze the influence of mtDNA haplogroups on the radiographic progression of OA in a well-characterized follow-up cohort of OA patients. The most striking findings of this work are that OA patients who carry the most common European mtDNA haplogroup H are more apt to require total joint replacement surgery than non-H carriers, and those patients in cluster TJ show a slower OA progression than patients belonging to cluster KU attending to radiographic worsening of the K/L score. However, given the borderline nature of the significance values and in order to consider the mtDNA haplogroups among the genetic variants under consideration when trying to identify patients at high risk of exacerbated radiographic progression of OA, these results must be replicated in an independent cohort. In this sense, we initiated the analysis of these mitochondrial variants on participants from the Osteoarthritis Initiative (OAI) to test their association with the radiographic progression of OA.

Acknowledgments The authors express appreciation to Lourdes Sanjurjo and María Dolores Velo and to the Department of Orthopaedic Surgery from the CHU A Coruña. This study was supported by grants from Fundación Española de Reumatología (programa GEN-SER) and from Fondo Investigación Sanitaria (CIBER- CB06/01/0040)-Spain, Fondo Investigación Sanitaria-PI 12/329 Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, with participation of funds from FEDER (European Community). Ignacio Rego-perez was supported by Contrato Miguel Servet-Fondo Investigación Sanitaria (CP12/03192).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict interest.

References

- Felson DT, Zhang Y (1998) An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 41(8):1343–1355
- Valdes AM, Spector TD (2011) Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7(1):23–32
- Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C (2011) The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7(3):161–169
- Maneiro E, Martin MA, de Andres MC et al (2003) Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 48(3):700–708
- Kim HA, Blanco FJ (2007) Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets* 8(2):333–345
- Cillero-Pastor B, Carames B, Lires-Dean M, Vaamonde-Garcia C, Blanco FJ, Lopez-Armada MJ (2008) Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 58(8):2409–2419
- Blanco FJ, Lopez-Armada MJ, Maneiro E (2004) Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* 4(5–6): 715–728
- Henrotin Y, Kurz B (2007) Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality? *Curr Drug Targets* 8(2):347–357
- Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW (2009) Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 17(1):107–113
- Torroni A, Huoponen K, Francalacci P et al (1996) Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144(4):1835–1850
- Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Lopez C, Arenas J, Blanco FJ (2008) Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 58(8):2387–2396
- Rego I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C et al (2010) Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Ann Rheum Dis* 69(1):210–213
- Soto-Hermida A, Fernandez-Moreno M, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, Rego-Perez I, Blanco FJ (2014) mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *Mitochondrion* 15:18–23
- Fang H, Liu X, Shen L et al (2014) Role of mtDNA haplogroups in the prevalence of knee osteoarthritis in a southern Chinese population. *Int J Mol Sci* 15(2):2646–2659
- Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Deberg M et al (2010) Mitochondrial DNA haplogroups modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 69(5):910–917
- Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Deberg M et al (2011) Mitochondrial DNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 70(4):646–652
- Garnero P, Ayral X, Rousseau JC et al (2002) Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46(10):2613–2624
- Valdes AM, Hart DJ, Jones KA et al (2004) Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 50(8):2497–2507
- Kamarainen OP, Solovieva S, Vehmas T et al (2008) Common interleukin-6 promoter variants associate with the more severe forms of distal interphalangeal osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 10(1):R21
- Attur M, Wang HY, Kraus VB, et al (2010) Radiographic severity of knee osteoarthritis is conditional on interleukin 1 receptor antagonist gene variations. *Ann Rheum Dis* 69(5):856–861
- Altman R, Asch E, Bloch D et al (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 29(8):1039–1049
- Zhang W, McWilliams DF, Ingham SL et al (2011) Nottingham knee osteoarthritis risk prediction models. *Ann Rheum Dis* 70(9):1599–1604
- Vilím V, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Kraus VB, Pavelka K (2002) Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 10(9):707–713
- Botha-Scheepers S, Riyazi N, Watt I et al (2009) Progression of hand osteoarthritis over 2 years: a clinical and radiological follow-up study. *Ann Rheum Dis* 68(8):1260–1264
- Martínez-Redondo D, Marcuello A, Casajús JA et al (2010) Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO2max consumer—is it a paradox? *Mitochondrion* 10(2):102–107
- Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E et al (2010) Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 19(17):3343–3353
- Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P et al (2003) Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(1):171–176



28. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR et al (2013) Mitochondrial DNA variants mediate energy production and expression levels for CFH, C3 and EFEMP1 genes: implications for age-related macular degeneration. *PLoS One* 8(1):e54339
29. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C et al (2000) Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 67(3):682–696
30. Larsen S, Díez-Sánchez C, Rabøl R, Ara I, Dela F, Helge JW (2014) Increased intrinsic mitochondrial function in humans with mitochondrial haplogroup H. *Biochim Biophys Acta* 1837(2):226–231
31. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC (2004) Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303(5655):223–226
32. Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283(5407):1482–1488
33. Mueller EE, Brunner SM, Mayr JA, 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
34. Hudson G, Panoutsopoulou K, Wilson I et al (2013) No evidence of an association between mitochondrial DNA variants and osteoarthritis in 7393 cases and 5122 controls. *Ann Rheum Dis* 72(1):136–139
35. Zeggini E, Panoutsopoulou K, Southam L et al (2012) Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet* 380(9844):815–823
36. Zhai G, Hart DJ, Kato BS, MacGregor A, Spector TD (2007) Genetic influence on the progression of radiographic knee osteoarthritis: a longitudinal twin study. *Osteoarthritis Cartilage* 15(2):222–225
37. Kerkhof HJ, Doherty M, Arden NK et al (2011) Large-scale meta-analysis of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms on risk of radiographic hip and knee osteoarthritis and severity of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19(3):265–271
38. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D et al (2007) A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 39(4):529–533
39. Takahashi H, Nakajima M, Ozaki K, Tanaka T, Kamatani N, Ikegawa S (2010) Prediction model for knee osteoarthritis based on genetic and clinical information. *Arthritis Res Ther* 12(5):R187
40. Valdes AM, Doherty M, Spector TD (2008) The additive effect of individual genes in predicting risk of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 67(1):124–127

3.3 CAPÍTULO 3:

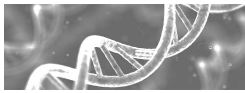
“Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups influence the progression of osteoarthritis. Data from the Osteoarthritis Initiative (OAI)”

Resumen capítulo 3: *Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups influence the progression of knee osteoarthritis. Data from the Osteoarthritis Initiative (OAI).*

La artrosis es una enfermedad articular caracterizada por una afectación de las estructuras que conforman la articulación, principalmente la degeneración y pérdida del cartílago articular junto con la alteración del hueso subcondral provocan la destrucción de la articulación y la pérdida de funcionalidad de la misma. En la artrosis intervienen tanto factores ambientales como genéticos interactuando entre ellos. Hasta el momento las medicaciones y terapias que se utilizan en la artrosis se limitan a mitigar el dolor y prevenir o reducir la discapacidad causada por la degeneración del cartílago y del hueso articulares. Además no existe un patrón único en el desarrollo de la patología, de modo que existen pacientes que se mantienen estables en los cambios estructurales de la articulación mientras que otros pacientes progresan en un corto periodo de tiempo. Por esto el papel de los biomarcadores genéticos y proteicos de la enfermedad pueden resultar claves no solo de cara a detectar la presencia de la enfermedad sino también a la hora de evaluar la progresión de la misma.

La *OAI* es una iniciativa público-privada que tiene como uno de sus objetivos primordiales el servir de soporte para el desarrollo y validación de marcadores bioquímicos y de imagen para detectar la presencia de la artrosis o el riesgo de padecerla aún cuando no existan cambios radiográficos o, si estos existen, sean todavía mínimos. La *OAI* posee una cohorte de pacientes muy bien caracterizada y sobre la que se hace un seguimiento en el tiempo y donde se evalúan los cambios estructurales, por medio de técnicas de imagen, que se puedan presentar en la rodilla y las demás articulaciones. La cohorte en estudio está formada por: a) pacientes que presentan artrosis sintomática de rodilla y que tienen riesgo de progresión en la misma y b) pacientes que presentan un elevado riesgo de desarrollar artrosis sintomática de rodilla.

En los últimos años diferentes trabajos científicos han demostrado la influencia de la mitocondria dentro de la patología artrósica. De este modo, la vía apoptótica mitocondrial es una de las principales rutas de apoptosis en el condrocito, las alteraciones a nivel mitocondrial en los condrocitos provocan



una respuesta inflamatoria relacionada a su vez con la producción de especies reactivas de oxígeno. En el mismo sentido existen evidencias científicas que demuestran la relación de los haplogrupos mitocondriales con la artrosis a diferentes niveles: i) en la prevalencia de la enfermedad en poblaciones europea y asiática; ii) en los niveles de biomarcadores moleculares de colágeno tipo II y de enzimas proteolíticas en suero; iii) menor producción de óxido nítrico en condrocitos así como mayor longitud de los telómeros.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, el objetivo de este estudio es evaluar la influencia de los haplogrupos en la progresión de la artrosis de rodilla en la cohorte americana del OAI.

Para alcanzar dicho objetivo se han utilizado los datos longitudinales obtenidos de las imágenes radiográficas y de resonancia magnética de rodillas artrósicas de pacientes de raza caucásica, pertenecientes a la sub-cohorte de progresión del *OAI*. En esta sub-cohorte se incluyen aquellos pacientes que al inicio del estudio presentaban artrosis de rodilla sintomática con dolor articular frecuente y signos radiográficos definidos de artrosis de rodilla, definidos como la presencia de osteofitos según la escala *OARSI*. El periodo de seguimiento fue de 48 meses para las imágenes radiográficas y de 24 meses para las imágenes de resonancia magnética.

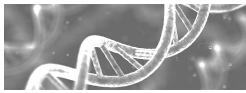
La asignación de los haplogrupos mitocondriales se realizó a partir del ADN proporcionado por la *OAI* y obtenido de la capa leucocitaria de muestras de plasma. El procedimiento para la asignación de los haplogrupos consistió en la identificación de los polimorfismos discriminatorios de los 6 haplogrupos mayoritarios en la población de origen caucásico utilizando un secuenciador automático de ADN, y empleando la técnica de SBE.. Los haplogrupos minoritarios europeos se asignaron mediante la técnica de *PCR-RFLP*.

El criterio para considerar progresión en las imágenes radiográficas fue el incremento de al menos un grado en la escala *OARSI* (0-III) para la reducción de espacio articular, la presencia de osteofitos y la esclerosis de hueso subcondral, todos ellos medidos en el compartimento tibial-medio. En el caso del grado *KL* se consideró progresión el aumento de al menos un grado entre radiografías. Además se evaluó la progresión de la artrosis a nivel estructural

comparando el espacio articular mínimo en el compartimento medial de la articulación entre aquellos pacientes que presentaban un estrechamiento del espacio articular unilateral en la zona medial para el tiempo de inicio del estudio. También se analizaron los datos de grosor y volumen de cartílago obtenidos a partir de las resonancias magnéticas durante un periodo de seguimiento de 24 meses. Todos estos datos se encuentran disponibles en la base de datos de la *OAI*.

Los resultados obtenidos mostraron que, en el caso de las imágenes radiográficas, los portadores del haplogrupo T presentaban una menor progresión en el tiempo tanto a nivel del grado *KL*, como de la reducción de espacio articular, presencia de osteofitos y desarrollo de esclerosis subcondral, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. El BMI es un factor de riesgo de progresión asociado al grado *KL*, la reducción de espacio articular y la presencia de osteofitos. Además la presencia de un grado *KL* elevado en el tiempo inicial de estudio se asoció como factor de riesgo de progresión para la reducción de espacio articular, la presencia de osteofitos y la esclerosis subcondral. Los portadores del haplogrupo T se mostraron además como los que menor tasa de progresión presentaban en las articulaciones que no mostraban reducción de espacio articular en el inicio del estudio.

En el análisis de los datos obtenidos de las imágenes de resonancia magnética se obtuvo que los portadores del haplogrupo T presentaban unas tasas significativamente menores de pérdida de volumen de cartílago en el tiempo en la zona medial de la tibia y el fémur así como en la zona central media del fémur, cuando se compararon sus valores con los de los portadores del haplogrupo H. Estos resultados mantuvieron su significación estadística en las zonas de la articulación analizadas cuando se utilizaron valores de volumen de cartílago normalizados (dividiendo por la superficie de hueso subcondral). Cuando se analizaron los valores de grosor de cartílago articular se observó que los pacientes portadores del haplogrupo T presentaban una tasa de pérdida de cartílago significativamente menor que los portadores del haplogrupo H en diferentes zonas del compartimento medial de la articulación,



no encontrándose diferencias significativas al comparar el haplogrupo H con los demás.



Mitochondrial DNA (mtDNA) Haplogroups Influence the Progression of Knee Osteoarthritis. Data from the Osteoarthritis Initiative (OAI)

Angel Soto-Hermida¹, Mercedes Fernández-Moreno¹, Natividad Oreiro¹, Carlos Fernández-López¹, Sonia Pértega², Estefania Cortés-Pereira¹, Ignacio Rego-Pérez^{1*}, Francisco J. Blanco^{1*}

1 Grupo de Genómica, 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, España, **2** Unidad de Epidemiología, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Sergas, Universidade da Coruña (UDC), A Coruña, España

Abstract

Objective: To evaluate the influence of the mtDNA haplogroups on knee osteoarthritis progression in Osteoarthritis Initiative (OAI) participants through longitudinal data from radiographs and magnetic resonance imaging (MRI).

Methods: Four-year knee osteoarthritis progression was analyzed as increase in Kellgren and Lawrence (KL) grade, in addition to increase in OARSI atlas grade for joint space narrowing (JSN), osteophytes and subchondral sclerosis in the tibia medial compartment of 891 Caucasian individuals from the progression subcohort. The influence of the haplogroups on the rate of structural progression was also assessed as the four-year change in minimum joint space width (mJSW in millimetres) in both knees of (n=216) patients with baseline unilateral medial-tibiofemoral JSN. Quantitative cartilage measures from longitudinal MRI data were those related to cartilage thickness and volume with a 24 month follow-up period (n=381).

Results: During the four-year follow-up period, knee OA patients with the haplogroup T showed the lowest increase in KL grade (Hazard Risk [HR]=0.499; 95% Confidence Interval [CI]: 0.261–0.819; p<0.05) as well as the lowest cumulative probability of progression for JSN (HR=0.547; 95% CI: 0.280–0.900; p<0.05), osteophytes (HR=0.573; 95% CI: 0.304–0.893; p<0.05) and subchondral sclerosis (HR=0.549; 95% CI: 0.295–0.884; p<0.05). They also showed the lowest decline in mJSW (standardized response means (SRM)=−0.39; p=0.037) in those knees without baseline medial JSN (no-JSN knees). Normalized cartilage volume loss was significantly lower in patients carrying the haplogroup T at medial tibia femoral (SRM=−0.33; p=0.023) and central medial femoral (SRM=−0.27; p=0.031) compartments. Cartilage thickness loss was significantly lower in carriers of haplogroup T at central medial tibia-femoral (SRM=−0.42; p=0.011), medial tibia femoral (SRM=−0.32; p=0.018), medial tibia anterior (SRM=+0.31; p=0.013) and central medial femoral (SRM=−0.19; p=0.013) compartments.

Conclusions: Mitochondrial genome seems to play a role in the progression of knee osteoarthritis. mtDNA variation could improve identification of patients predisposed to faster or severe progression of the disease.

Citation: Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Oreiro N, Fernández-López C, Pértega S, et al. (2014) Mitochondrial DNA (mtDNA) Haplogroups Influence the Progression of Knee Osteoarthritis. Data from the Osteoarthritis Initiative (OAI). PLoS ONE 9(11): e112735. doi:10.1371/journal.pone.0112735

Editor: Mario D. Cordero, University of Sevilla, Spain

Received: August 10, 2014; **Accepted:** October 14, 2014; **Published:** November 12, 2014

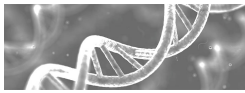
Copyright: © 2014 Soto-Hermida et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by grants from Fundación Española de Reumatología (programa GEN-SER) and from Fondo Investigación Sanitaria (CIBERCB06/01/0040)-Spain, Fondo Investigación Sanitaria-PI 08/2028, Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, with a contribution of funds from FEDER (European Community). IRP was supported by Contrato Miguel Servet-Fondo Investigación Sanitaria (CP12/03192). The authors would like to thank the participants, principal investigators, coinvestigators and staff of the OAI. The Osteoarthritis Initiative (OAI) is a public-private partnership comprised of five contracts (N01-AR-2-2258; N01-AR-2-2259; N01-AR-2-2260; N01-AR-2-2261; N01-AR-2-2262) funded by the National Institutes of Health, a branch of the Department of Health and Human Services, and conducted by the OAI Study Investigators. Private funding partners include Pfizer, Inc.; Novartis Pharmaceuticals Corporation; Merck Research Laboratories; and GlaxoSmithKline. Private sector funding for the OAI is managed by the Foundation for the National Institutes of Health. This manuscript was prepared using an OAI public use data set and does not necessarily reflect the opinions or views of the OAI investigators, the NIH, or the private funding partners. This manuscript has received the approval of the OAI Publications Committee based on a review of its scientific content and data interpretation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have the following interests. The Osteoarthritis Initiative (OAI) is a public-private partnership comprised of five contracts. Private funding partners include Pfizer, Inc.; Novartis Pharmaceuticals Corporation; Merck Research Laboratories; and GlaxoSmithKline. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* Email: fblagar@sergas.es (FJB); igancio.rego.perez@sergas.es (IRP)



Introduction

Osteoarthritis (OA), the most common joint disease related to ageing, is characterized by the degeneration of articular cartilage, affecting subchondral bone and soft tissue and leading to joint destruction and severe impairment of mobility [1]. OA is also the leading cause of permanent work incapacitation and one of the most common reasons for visiting primary care physicians. OA is a multifactorial disease in which a combination of both environmental and genetic factors interact [2–4].

At present, therapies available to treat OA are limited. Most current treatments are designed only to relieve pain and reduce or prevent the disability caused by bone and cartilage degeneration. Furthermore, clinical testing of new therapies is complicated by the highly variable way OA manifests in individual patients; it is established that some OA patients remain relatively stable over time, while others progress more rapidly to severe structural deterioration often leading to joint replacement. The usefulness of both genetic and protein biomarkers in OA is to predict, not only the risk of OA at an earlier stage of the disease [5], but also which OA patients are more likely to progress to severe disease. Some studies have evaluated the role of genetic factors in the severity or progression of OA [6–9] and, to date, relatively little is known about risk factors for radiographic knee OA progression, despite their great clinical importance.

The Osteoarthritis Initiative (OAI) is a public-private partnership that provides new resources and commitment to help find biochemical, genetic and imaging biomarkers for onset and progression of knee OA. One of the important goals of the OAI is to support development and validation of imaging and biochemical markers that indicate either the presence of OA, or an increased risk for OA, even when radiograph changes are minimal or absent, and which can accurately predict the subsequent course of disease. An essential step to achieve these goals is the assessment of biomarkers in longitudinal studies, over a period of time in which clinical change can be clearly defined, in large, well-characterized populations of persons with OA or who are developing OA.

The OAI cohort study has a public archive of data, biological samples and joint images collected over time from a clinically well characterized population of individuals comprising two subgroups, i) those with clinically significant knee OA who are at risk of disease progression; and ii) individuals who are at high risk for developing clinically significant knee OA. Participants are followed for four years for changes in the clinical status of the knee and other joints, including worsening and onset of symptoms and disabilities, worsening and onset of knee structural abnormalities, and changes in other imaging and biochemical markers of knee OA. Therefore, the use of this cohort of samples confers an extra degree of exceptionality to this work.

In recent years, a growing body of evidence suggests the implication of the mitochondria in the pathogenesis of OA [1,10–12]; mitochondrial function is altered in OA chondrocytes [13] and the mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes [14,15]. Besides, the apoptotic mitochondrial pathway is one of the major cellular pathways for apoptosis of OA chondrocytes [16] and the inhibition of complexes III and V of the mitochondrial respiratory chain (MRC) causes an increased inflammatory response potentially related to the production of reactive oxygen species (ROS) [14]. Mitochondrial free radical production compromises chondrocyte function [17,18], causing mtDNA damage and reduced mtDNA capacity for repair [19].

In addition to mitochondrial dysfunction, mitochondrial genetics seems to play a role in the OA disease too. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups, defined as individual groups characterized by the presence of a particular set of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the mtDNA sequence [20], have been shown to be related to OA at different levels: i) prevalence of the disease in Spanish [6,21] and Asian [22] populations; ii) complementary genetic markers for the serum levels of collagen type II molecular biomarkers [23] and proteolytic enzymes [24]; and iii) lower nitric oxide (NO) production in human articular chondrocytes as well as higher telomere length [25].

In consideration of this background and the discovery of the role of mitochondria in OA, the aim of this study is to evaluate the occurrence of the mtDNA haplogroups in the progression of knee OA. For this purpose, we used the longitudinal data obtained from radiographs and magnetic resonance images (MRI) of knee OA patients belonging to the progression subcohort of the OAI.

Materials and Methods

Data used in the preparation of this article were obtained from the Osteoarthritis Initiative (OAI) database, which is available for public access at <http://www.oai.ucsf.edu/>. The Osteoarthritis Initiative (OAI) is a public-private partnership comprised of five contracts (N01-AR-2-2258; N01-AR-2-2259; N01-AR-2-2260; N01-AR-2-2261; N01-AR-2-2262) funded by the National Institutes of Health, a branch of the Department of Health and Human Services, and conducted by the OAI Study Investigators. Private funding partners include Pfizer, Inc.; Novartis Pharmaceuticals Corporation; Merck Research Laboratories; and GlaxoSmith-Kline. Private sector funding for the OAI is managed by the Foundation for the National Institutes of Health. The study was reviewed and approved by Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (Ref# 2008/144). Specific datasets used are the 0.2.2 clinical dataset and 0.6, 1.6, 3.5, 5.3, 5.5, 6.3, 0.5 and 1.5 imaging datasets.

Participants

DNA from all the participants, provided by the OAI, was previously isolated from buffy coat from plasma samples. All the participants analyzed in this study ($N = 891$) were of Caucasian ancestry and belonged to the progression subcohort of the OAI (**Table 1**). This subcohort includes patients with symptomatic tibiofemoral knee OA at baseline with frequent knee symptoms (pain, aching or stiffness) and radiographic tibiofemoral knee OA defined as tibiofemoral osteophytes (OARSI atlas grades 1–3 [26], equivalent to Kellgren and Lawrence (KL) grade ≥ 2) on the fixed flexion radiographs.

The follow-up period was 48 months for radiographic data and 24 months for magnetic resonance imaging (MRI) data.

All the clinical centers of the OAI have made provisions to ensure the safety, confidentiality and ethical treatment of study participants according to the Declaration of Helsinki. In this sense, all the OAI participants signed an informed consent.

mtDNA haplogroups genotyping

The mtDNA haplogroups of all OA patients were assessed following DNA isolation using a previously described assay [6]. Briefly, a multiplex polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify six mtDNA fragments that contain each of the informative SNPs that characterize the most common European mtDNA haplogroups (H, V, HV*, U, J and T). The resulting PCR fragments were further purified and analyzed by the Single Base Extension (SBE) assay and the informative SNPs were

Table 1. Demographic characteristics of the study population at baseline grouped by mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups in the progression subcohort of the OAI.

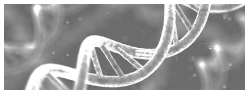
mtDNA haplogroups						
Characteristic	H (N = 341, 38.27%)	J (N = 89, 9.99%)	T (N = 85, 9.54%)	Uk (N = 228, 25.6%)	Others (N = 148, 16.61%)	Total (N = 891)
Age at baseline (years)	62.2±9.1	60.3±9.9	61.6±9.5	62.4±9.5	61.4±9.6	0.378* 61.9±9.4
Gender:	0.792#					
Male	164 (48.1)	41 (46.1)	45 (52.9)	111 (48.7)	66 (44.6)	427 (47.9)
Female	177 (51.9)	48 (53.9)	40 (47.1)	117 (51.3)	82 (55.4)	464 (52.1)
BMI (Kg/m ²)	29.6±4.5	29.6±4.8	29.6±4.5	29.2±4.9	29.2±4.4	0.596* 29.4±4.6
BMI≤30	192 (56.3)	50 (56.2)	50 (58.8)	138 (60.5)	92 (62.2)	0.721# 522 (58.6)
BMI>30	149 (43.7)	39 (43.8)	35 (41.2)	90 (39.5)	56 (37.8)	0.851# 369 (41.4)
KL grade at baseline (worst knee)**	0.851#					
0-I	45 (14.0)	9 (10.8)	9 (11.3)	31 (14.8)	21 (14.9)	115 (13.8)
II-IV	277 (86.0)	74 (89.2)	71 (88.8)	179 (85.2)	120 (85.1)	721 (86.2)
KL grade at baseline (less severe knee)	0.538#					
0-I	142 (44.1)	39 (47.0)	34 (42.5)	105 (50.0)	71 (50.4)	391 (46.8)
II-IV	180 (55.9)	44 (53.0)	46 (57.5)	105 (50.0)	46 (57.5)	445 (53.2)
mJSN at baseline (worst knee)	0.777#					
0-I	179 (55.6)	43 (51.8)	46 (57.5)	113 (53.8)	84 (59.6)	465 (55.6)
II-III	143 (44.4)	40 (48.2)	34 (42.5)	97 (46.2)	57 (40.4)	371 (44.4)
mJSN at baseline (less severe knee)	0.885#					
0-I	280 (87.0)	73 (88.0)	67 (83.8)	180 (85.7)	119 (84.4)	719 (86.0)
II-III	42 (13.0)	10 (12.0)	13 (16.3)	30 (14.3)	22 (15.6)	117 (14.0)
Osteophytes tibia medial (worst knee)	0.046#					
0-I	192 (67.4)	39 (52.7)	41 (56.9)	107 (57.5)	82 (66.7)	461 (62.3)
II-III	93 (32.6)	35 (47.3)	31 (43.1)	79 (42.5)	41 (33.3)	279 (37.7)
Osteophytes tibia medial (less severe knee)	0.577#					
0-I	267 (93.7)	68 (91.9)	66 (91.7)	174 (93.5)	119 (96.7)	694 (93.8)
II-III	18 (6.3)	6 (8.1)	6 (8.3)	12 (6.5)	4 (3.3)	46 (6.2)
Sclerosis tibia medial (worst knee)	0.131#					
0-I	181 (63.5)	37 (50.0)	46 (63.9)	110 (59.1)	83 (67.5)	457 (61.8)
II-III	104 (36.5)	37 (50.0)	26 (36.1)	76 (40.9)	40 (32.5)	283 (38.2)
Sclerosis tibia medial (less severe knee)	0.494#					
0-I	268 (94.0)	66 (89.2)	65 (90.3)	168 (90.3)	112 (91.1)	679 (91.8)
II-III	17 (6.0)	8 (10.8)	7 (9.7)	18 (9.7)	11 (8.9)	61 (8.2)

Values are mean±standard deviation or number of patients with percentage in parentheses; OAI: osteoarthritis initiative; (*) Kruskal-Wallis non-parametric test for comparison between mtDNA haplogroups; (#) Chi-square test; BMI: body mass index; KL: Kellgren and Lawrence; mJSN: Joint space narrowing in medial compartment; (**) The worst knee and the less severe knee at baseline were designated, respectively, as the knee with the highest and lowest KL (Kellgren and Lawrence) grade, OARSI JSN (joint space narrowing) grade, OARSI osteophytes grade or OARSI sclerosis grade, as appropriate on each case; significant p-values are in bold. doi:10.1371/journal.pone.0112735.t001

visualized after loading the purified SBE product into an ABI 3130 XL genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States). The less common haplogroups (W, I, X and others) were assessed using PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) according to the hierarchical scheme previously described [6]. The assigned mtDNA haplogroups were verified by sequencing the entire mtDNA control region in 30% of the samples and analysing some of the key SNPs described in phylotree (<http://www.phylotree.org>).

Progression criteria

We analyzed radiographic knee OA progression during the follow-up period (48 months) in terms of the KL grade, defining progression as an increase of at least one KL grade in either knee. Additionally, we also analyzed the development or progression of i) joint space narrowing in the medial compartment (mJSN), ii) osteophytes in the tibia medial compartment and iii) subchondral sclerosis in the tibia medial compartment. The progression criterion for each of these three features was an increase of at least one OARSI atlas grade in either knee.



We also analyzed the influence of the mtDNA haplogroups on the rate of structural progression in both knees of patients with baseline unilateral medial JSN (OARSI atlas grade 1–3) and no JSN in the lateral compartment (OARSI atlas grade <1). For this purpose, we analyzed the four-year change in radiographic medial joint space width (mJSW) at the minimum JSW in the medial compartment of both knees (baseline JSN knees and baseline no-JSN knees) of 216 OA patients that met the eligibility criteria.

Description of the MRI data

For this study, we analyzed the data obtained from measurements of cartilage volume and thickness from serial knee MRI scans performed by Felix Eckstein's group in Germany (Chondrometrics, GmbH, Ainring) or Austria (Paracelsus University, Salzburg) (<http://www.chondrometrics.com/>) and contained in different datasets (Projects) of the OAI. These data consisted in a longitudinal study with a 24 month follow-up period of 381 knee OA patients (190 right knees and 191 left knees) in the progression subcohort (namely Project 9). We analyzed data from measurements of the femoral region defined as the 75% of the distance between the trochlear notch and the posterior of the femoral condyle (**Figure S1**).

The image analysis relied on sagittal DESS (double echo steady-state) sequence of either the right or left knee [27,28]. Segmentation of the cartilages was performed at the image analysis center (Chondrometrics GmbH, Ainring, Germany).

Sample size of the study

The sample size of $n = 891$ patients allows the probability of OA progression to be estimated with $\pm 3.3\%$ precision using a 95% confidence interval. Additionally, “protective” hazard ratios (HR) < 0.6 associated with an haplogroup present in at least 10% of the population will be detected as statistically significant with 80% power using a significant level of 0.05. This assumes a censoring probability of 60%.

To analyze the four-year change in medial JSW in patients with unilateral medial JSN, $n = 216$ OA patients were included in the analysis. Assuming a standard deviation of ± 1 , this sample size will allow us to detect as statistically significant mean differences of 0.6 or higher for the less frequent haplogroup ($n = 24$), with 80% power and a significant level of 0.05.

For the analysis of cartilage integrity from MRI, data on $n = 381$ patients are available. This sample size will allow to detect as statistically significant a standardized mean difference of 0.35 or higher in the variables analyzed between the most and the less frequent haplogroup (assuming a ratio 1:4), with a 95% confidence level and 80% statistical power.

Statistical analysis

Briefly, for the multivariate analysis of radiographic progression and MRI data, comparisons between haplogroups were performed considering the most common mtDNA haplogroup, H, as the reference group. Therefore, in order to introduce mtDNA haplogroups in the models, a dummy coding was used, with the haplogroup H as the reference group. Since there was no interest in all possible pair-wise comparisons, no additional adjusting for multiple comparisons was done.

Statistical analyses were performed using IBM-SPSS software, release 19 (IBM, Armonk, NY, USA) and R software v3.0.2 (The R Foundation for Statistical Computing). All comparisons were two-sided, with $p < 0.05$ defined as statistically significant.

Analysis of radiographic progression. Because the status of a patient was prospectively evaluated at predefined intervals (12, 24, 36 and 48 months), the precise date at which progression

occurred could not be determined; it always occurred between visits. Only the interval during which the conversion occurred was observed, therefore such information is said to be interval-censored [29].

To avoid potential biases associated with the use of standard survival analysis in this context, interval-censored data analysis methods were used [29]. Turnbull's extension of the Kaplan-Meier curve to interval-censored data was used to estimate the cumulative probability of progression over time (survivor function) according to the mtDNA haplogroups [30]. An extended Cox proportional hazard model using the iterative convex minorant algorithm was used for multivariate analysis adjusting for the confounder effects of gender, age, BMI, radiographic status of the worst knee (highest KL grade, highest JSN OARSI grade, highest osteophytes OARSI grade or highest sclerosis OARSI grade, as appropriate on each case) and previous surgery, all of them at baseline [31]. Due to difficulties in deriving the asymptotic behavior of statistic tests based on interval-censored data, statistical significance was tested by confidence intervals (CIs) for the hazard ratios (HR) by means of resampling methods. Therefore, CIs were obtained using the bootstrap methodology (1000 replicates) with the percentile method.

To analyze the influence of the mtDNA haplogroups on four-year change in medial JSW (mJSW) from baseline, we focused on patients with unilateral medial JSN and no JSN in the lateral compartment. The JSN knees and no-JSN knees were modeled separately. The mean comparison of the difference between mJSW at baseline and mJSW at final visit (4 years) was further performed by means of an analysis of covariance (ANCOVA) comparing each of the mtDNA haplogroups with the rest pooled together and adjusting for the confounder effects of gender, age and BMI at baseline. Previously, we tested for possible significant associations of the mtDNA haplogroups with KL grade and mJSN at baseline for both JSN and no-JSN knees in this cohort of ($n = 216$) patients by means of chi-square analyses. Additionally, the standardized response means (SRM), defined as the mean change divided by the standard deviation (SD) of change, was used to measure the sensitivity to change.

Analysis of MRI data in the OAI cohort. The parameters analyzed were those related to both cartilage volume and thickness in representative subregions of the joint (**Figure S2**). The parameters for cartilage volume were: cartilage volume in the medial tibia femoral compartment (MFTC.VC) and central medial femoral (cMF.VC) and normalized cartilage volume in the medial tibia femoral compartment (MFTC.VCtAB) and the central medial femoral (cMF.VCtAB). We also analyzed the mean cartilage thickness in the central medial tibia femoral compartment (weight bearing) (cMFTC.ThCtAB), medial tibia femoral compartment (MFTC.ThCtAB), medial tibia (anterior) (aMT.ThCtAB) and central medial femoral (center) (ccMF.ThCtAB).

The mean change (MC) and standard deviation (SD) of change between baseline (T_0) and 24 months (T_2) were used as a measure of progression. The SRM was used as a measure of sensitivity to change. The influence of mtDNA haplogroups on changes over time in quantitative MRI scans data, between T_0 and T_2 , was evaluated through a linear mixed-effects random-intercept and random-slope repeated measures analysis [32]. This model assumes that patient effects (intercepts) and time effects (slopes—MRI data changes over time) are random among patients, taking into account the correlation among repeated measurements in the same individual. Regression coefficients were also estimated for the interaction between time and mtDNA haplogroup, allowing the rate of change to vary from one haplogroup to another. Models

Table 2. Cumulative probability of osteoarthritis progression according to mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and results of the extended Cox proportional hazard model.

Variables	KL grade		JSN		Osteophytes		Subchondral sclerosis		
	N(%Progressors) ^y	HR	95% CI ^z	N(%Progressors) ^y	HR	95% CI ^z	N(%Progressors) ^y	HR	95% CI ^z
Gender (male)		0.672	0.528–0.859*		1.006	0.755–1.335		0.843	0.650–1.081
Age (years)		1.011	0.999–1.024		0.998	0.982–1.013		0.993	0.980–1.007
BMI (kg/m ²)		1.045	1.020–1.069*		1.052	1.021–1.084*		1.028	1.004–1.053*
Previous surgery		0.909	0.702–1.190		0.686	0.487–0.909		0.981	0.739–1.282
Worst knee at bl ^z		0.937	0.687–1.305		4.993	3.700–7.373*		1.799	1.405–2.314*
mtDNA haplogroups									
H (n = 341)	145 (42.5%)	1		111 (32.6%)	1		164 (48.0%)	1	136 (39.8%)
J (n = 89)	40 (44.3%)	1.147	0.731–1.655	28 (31.4%)	0.891	0.581–1.404	45 (51.1%)	1.090	0.715–1.611
UK (n = 228)	100 (44.1%)	0.986	0.760–1.356	64 (28.4%)	0.741	0.530–1.049	106 (46.8%)	0.906	0.684–1.203
T (n = 85)	19 (22.0%)	0.499	0.261–0.819*	17 (19.7%)	0.547	0.280–0.900*	25 (29.0%)	0.573	0.304–0.893*
Others (n = 148)	53 (36.0%)	0.786	0.542–1.099	35 (23.7%)	0.699	0.445–1.051	50 (34.1%)	0.687	0.500–1.013

KL: Kellgren and Lawrence; JSN: joint space narrowing; BMI: body mass index; bl: baseline; ^y: cumulative osteoarthritis progression rate after 48 months of follow-up; HR: hazard ratio; CI: confidence interval; ^z: confidence intervals for the hazard ratios obtained using the bootstrap methodology by the percentile method; (-): the worst knee at baseline refers to the radiological status of the knee attending to (highest) KL grade, JSN grade, osteophytes grade or sclerosis grade, as appropriate on each case; (*): statistical significance declared at p=0.05.
doi:10.1371/journal.pone.0112735.t002

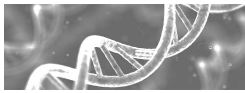


Table 3. Mean differences in mJSW change over 4 years at minimum mJSW among the mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups in 216 OA patients.

mtDNA haplogroups	JSN knees (N = 216)			No-JSN knees (N = 216)		
	Mean change±SD	SRM	p-value [#]	Mean change±SD	SRM	p-value [#]
H (N = 87)	-0.52±0.68	-0.77	0.688	-0.56±1.07	-0.52	0.754
J (N = 24)	-0.75±0.86	-0.87	0.217	-0.62±0.78	-0.79	0.578
T (N = 24)	-0.56±0.77	-0.73	0.919	-0.14±0.37	-0.39	0.034*
Uk (N = 44)	-0.53±0.68	-0.77	0.995	-0.61±1.12	-0.59	0.336
Others (N = 37)	-0.48±0.68	-0.71	0.662	-0.45±0.65	-0.69	0.886

Data are mean±standard deviation, in millimetres (mm); mJSW: medial joint space width; JSN: joint space narrowing; SD: standard deviation; SRM: standardized response means (mean divided by SD); (#) multivariate (ANCOVA) analysis, adjusting for gender, age and body mass index (BMI) at baseline; (*) indicates statistical significance at p=0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0112735.t003

were also adjusted for potential confounding factors, including age, gender and BMI.

Results

Influence of the mtDNA haplogroups on radiographic knee OA progression

No significant differences in baseline characteristics, including age, gender and BMI of the study population, as well as the radiographic variables at baseline, were detected among the different mtDNA haplogroups, even when analyzed the *worst knee* and the *less severe knee*, except for the presence of osteophytes in the worst knee (p = 0.047) (Table 1). The *worst knee* and the *less severe knee* at baseline were designated, respectively, as the knee with the highest and lowest KL grade, OARSI JSN grade, OARSI osteophytes grade or OARSI sclerosis grade, as appropriate on each case. We then analyzed the increase of KL grade in knee OA patients as well as the radiographic progression or development of JSN, osteophytes and subchondral sclerosis.

After adjusting for age, gender, BMI, previous surgery and radiographic status of the worst knee at baseline, the results showed that the percentage of patients that experienced any increase in the KL grade during the follow-up period was significantly lower in carriers of the mtDNA haplogroup T (HR = 0.499; 95% CI: 0.261–0.819; p < 0.05); in addition, these patients also showed less development of JSN (HR = 0.547; 95% CI: 0.280–0.900; p < 0.05), osteophytes (HR = 0.573; 95% CI: 0.304–0.893; p < 0.05) and subchondral sclerosis (HR = 0.549; 95% CI: 0.295–0.884; p < 0.05) (Table 2).

BMI at baseline was found to be a risk factor for radiographic progression (p < 0.05) in terms, not only of KL grade (HR = 1.045; 95% CI: 1.020 – 1.069), but also JSN (HR = 1.052; 95% CI: 1.021–1.084) and osteophytes (HR = 1.028; 95% CI: 1.004–1.055) besides, radiographic status of worst knee at baseline significantly associates (p < 0.05) with increased development of JSN (HR = 4.993; 95% CI: 3.700–7.373), osteophytes (HR = 1.799; 95% CI: 1.405–2.314) and sclerosis (HR = 1.396; 95% CI: 1.050–1.827) during the follow-up period; male gender was also associated with lower risk for disease progression (p < 0.05) in terms of KL grade (HR = 0.672; 95% CI: 0.528–0.859) (Table 2).

The analysis of the influence of the mtDNA haplogroups on the rate of structural progression in no-JSN knees, assessed by means of the minimum mJSW, showed carriers of the mtDNA haplogroup T with the lowest decline over time (SRM = -0.39; p = 0.037) (Table 3). Additionally, no significant differences were detected in KL grade and mJSN at baseline, in both JSN and no-

JSN knees, among the mtDNA haplogroups in this cohort of 216 patients (data not shown).

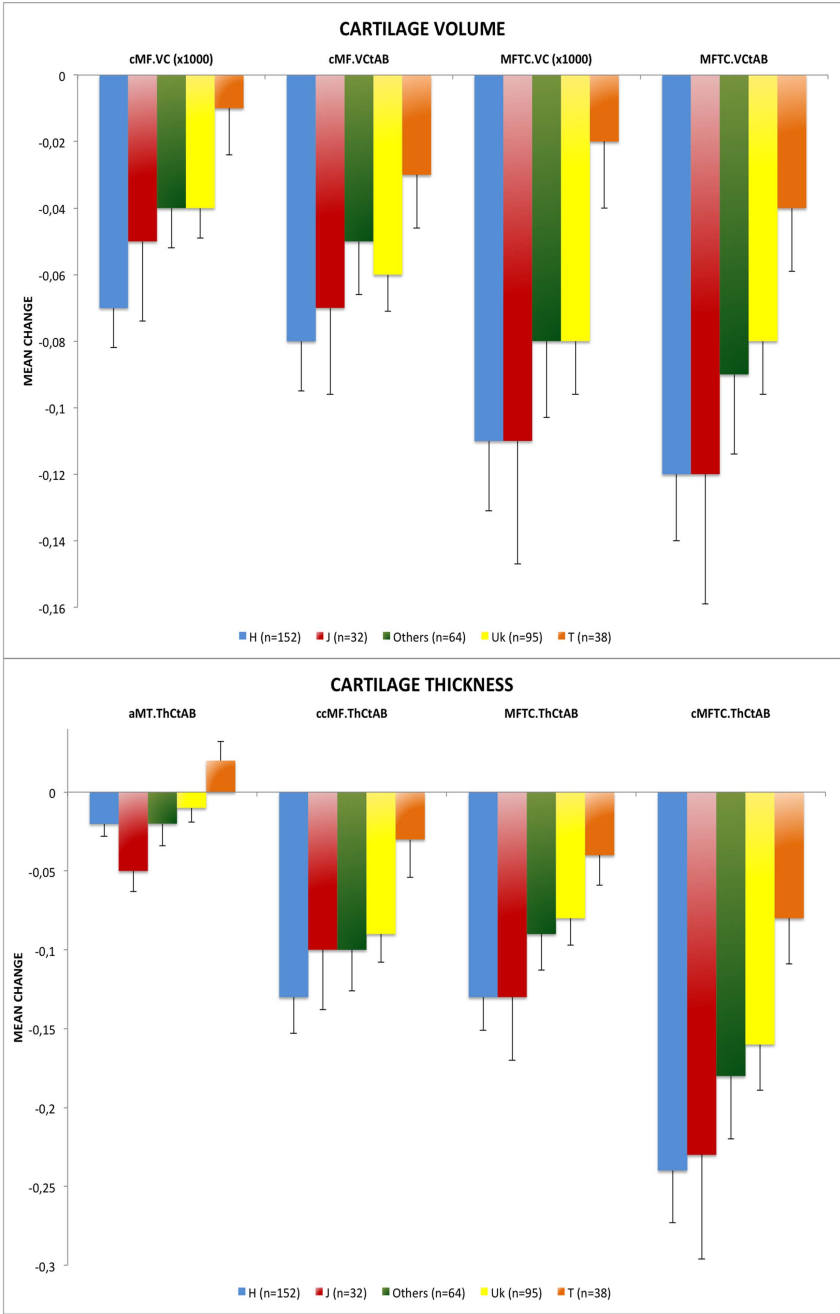
Influence of the mtDNA haplogroups on knee cartilage integrity. Data from MRI

Longitudinal analysis of cartilage volume. A significant decline in knee cartilage volume over time was detected (p < 0.001). Patients that carry the mtDNA haplogroup T showed significantly lower declines in volume over time in medial tibia femoral (p = 0.015) (MC = -0.02 × 10³ ± 0.12 mm³) and central medial femoral (p = 0.015) (MC = -0.01 × 10³ ± 0.08 mm³) compartments compared with the most common mtDNA haplogroup H (MC = -0.11 × 10³ ± 0.25 mm³ and -0.07 × 10³ ± 0.15 mm³, respectively). When the normalized cartilage volume (cartilage volume divided by total area of subchondral bone) of these two subregions was analyzed, the results obtained were similar and carriers of the mtDNA haplogroup T also showed significantly lower declines in normalized volume in medial tibia femoral (p = 0.023) (MC = -0.04 ± 0.12 mm) and central medial femoral (p = 0.031) (MC = -0.03 ± 0.10 mm) compartments (MC = -0.12 ± 0.25 mm and -0.08 ± 0.18 mm, respectively) (Figure 1a, Table 4 and Table S1). No differences were found in the rate of change between mtDNA haplogroup H and the other mtDNA haplogroups.

Longitudinal analysis of cartilage thickness. A significant decline in cartilage thickness over time was observed (p < 0.001). When compared with carriers of mtDNA haplogroup H, patients with haplogroup T had significantly lower declines in thickness over time in central medial tibia femoral (weight bearing) (MC = -0.08 ± 0.18 mm versus -0.24 ± 0.41 mm, p = 0.011), medial tibia femoral (MC = -0.04 ± 0.12 mm versus -0.13 ± 0.26 mm, p = 0.018), medial tibia (anterior) (MC = +0.02 ± 0.08 mm versus -0.02 ± 0.10 mm, p = 0.013) and central medial femoral (center) (MC = -0.03 ± 0.14 mm versus -0.13 ± 0.29 mm, p = 0.013) compartments (Figure 1b, Table 4 and Table S1). Similar to cartilage volume, no differences in the loss rate of knee cartilage thickness over time were detected between mtDNA haplogroup H and the other haplogroups.

Discussion

To our knowledge, this is the first study to use the well characterized follow-up OAI cohort to analyze the influence of genetic factors on disease progression. Specifically, this study attempts to analyze the influence of mtDNA haplogroups on the progression of knee OA. The results obtained reveal that patients



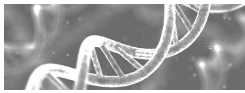


Figure 1. Figure 1a. Longitudinal change between baseline and 24 months in cartilage volume grouped by mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups. MFTC.VcTAB: normalized cartilage volume in medial tibia femoral compartment; cMF.VcTAB: normalized cartilage volume in central medial femoral; MFTC.Vc: cartilage volume in medial tibia femoral compartment; cMF.Vc: volume of cartilage in central medial femoral. MFTC.Vc and cMF.Vc that are shown in cubic millimeters (mm³) and MFTC.VcTAB and cMF.VcTAB are shown in square centimeters (cm²); (*) indicates statistical significance ($p < 0.05$). Values are mean change \pm SE (standard error). **Figure 1b.** Longitudinal change between baseline and 24 months in cartilage thickness grouped by mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups. cMFTC.ThCtAB: mean cartilage thickness in central medial tibia femoral compartment (weight-bearing); MFTC.ThCtAB: mean cartilage thickness in medial tibia femoral compartment; aMT.ThCtAB: mean cartilage thickness in medial tibia (anterior); ccMF.ThCtAB: mean cartilage thickness in central medial femoral (center). All of them represented in millimeters (mm); (*) indicates statistical significance ($p < 0.05$). Values are mean change \pm SE (standard error). doi:10.1371/journal.pone.0112735.g001

in the progression subcohort carrying mtDNA haplogroup T show not only a significantly lower cumulative probability of progression in KL grade, but also less development of mJSN, osteophytes and subchondral sclerosis in the medial tibia. These observations were further strengthened by analyzing the evolution of cartilage integrity over two years showing a significantly reduced loss of knee cartilage thickness and volume in carriers of mtDNA haplogroup T too.

Previous findings reported in a Spanish cohort showed that patients with haplogroups belonging to cluster TJ had slower radiographic OA progression attending to KL grade [33]. Interestingly, an association study between haplogroups and OA prevalence in Spanish populations revealed a significant overrepresentation of the cluster TJ in radiological knee healthy subjects [6]. This association was further partially replicated in a larger cohort of hip OA patients from the same location, showing an association of the mtDNA haplogroup J with lower prevalence of hip OA [21]. Moreover, in another recent work, the mtDNA haplogroup T appeared overrepresented in knee healthy subjects from the United Kingdom after performing a regression model adjusting for gender and age [34].

To date, the study presented here is the first and most complete progression study involving the mtDNA haplogroups and OA using the cohort of the OAI; the results obtained should not be interpreted as discrepant in relation to previous findings, not only because this work does not analyze the association of mtDNA haplogroups with the prevalence of OA, but also because both above-mentioned mtDNA haplogroups T and J are considered "sister" haplogroups that share the same phylogenetic origin (the mtDNA cluster TJ) [35,36] that comprises a set of uncoupling mutations which, in combination with certain nuclear backgrounds, have been described to have common functional characteristics in their OXPHOS system such as decreased ATP production and reduced ROS generation [37–39].

A recent work by Hudson and co-workers found no evidence of an association between mtDNA variants and the prevalence of OA [40]. However, some points could explain this; first, as postulated by the authors, the relative contribution of specific mtDNA variants could vary in different ethnic groups by means of homoplasy and/or geographic differences in the finer details of sub-haplogroup structures of mtDNA [40]. In this sense, population-specific associations of the mtDNA haplogroups, probably due to their interaction with environmental factors [41] as a result of their adaptation to colder climates [35,36,42], have also been described [43,44]; second, as the authors describe in their manuscript, the GWAS study performed by the arcOGEN consortium also failed to replicate previous associations involving other genes described in OA at genome-wide significance levels, such as GDF5, chromosome 7q22 and MCF2L [45]; third, control samples from the arcOGEN study are only asymptomatic with no radiographic information, thus the selection of adequate healthy controls for association studies in the OA disease is a crucial for successfully conclusions.

The risk of structural progression in a knee without baseline JSN (no-JSN knee) is higher when the contralateral knee has already lost some space (JSN-knee); therefore, some authors suggest that the no-JSN knee would be the target knee in clinical trials because it would be expected to have less damage than a JSN knee but may have a significant progression over time due to the prevalence of contralateral JSN [46,47]. In order to evaluate the feasibility of detecting drug effects in clinical trials, we have quantified the mJSW following a similar approach to that described by Benichou and co-workers [48]. Results showed that OA patients with the mtDNA haplogroup T had lower rate of structural progression in no-JSN knees. These results point to take into consideration the mtDNA haplogroups when clinical trials in this population are performed.

The medial compartment is generally heavily loaded and knee OA affects this compartment more often than the lateral one [49,50]; therefore the analysis of MRI images carried out in this work was performed in regions/subregions that were previously characterized among the most sensitive to change in knee OA: the central medial tibia femoral compartment and medial tibia femoral compartment [28,51–54], as well as other regions of interest such as the central medial femoral condyle and medial tibia (anterior). The conclusion drawn is that OA patients carrying the mtDNA haplogroup T had a significantly lower decline of cartilage thickness and volume over time in these medial subregions.

A key part of the variation in different clinical forms of OA is attributable to genetics [55]. In relation to OA progression, previous studies by other investigators reported that genetic variants of genes, such as interleukin-1 receptor antagonist (IL1RN) [9,56,57] or cartilage intermediate-layer protein (CILP) [7], influence the severity and progression of OA. A functional polymorphism in the 5'-UTR of the growth differentiation factor-5 (GDF-5) gene has also been consistently associated with OA susceptibility and was part of a prediction model for knee OA based on genetic and clinical information [58,59]. The results of the present study strengthen the role of genetic variation, including mitochondrial genetics, in OA as previously described [1,3].

This study has some points that must be clarified; i) in relation to confounding factors, the analyses were finally adjusted for potential confounders such as age, gender, BMI and, in the radiographic progression, previous surgery and the radiographic status of the worst knee at baseline. Other predictors of OA occurrence or progression over time, such as bone marrow lesions or meniscal lesions, were also analyzed but finally not taken into account because of the small number of patients without missing data. On the other hand, ii) a key strength of this study is the analysis performed; the use of interval-censored data analysis to determine the probability of knee OA progression according to the mtDNA haplogroups avoids biases associated with the use of standard survival analysis in this context. Moreover, the use of linear mixed models in the analysis of MRI data allows us to take into account all available observations for each patient over time,

Table 4. Random-coefficients linear mixed model to analyze the influence of mtDNA haplogroups on change in cartilage volume (upper) and thickness (lower) over time in 381 knee OA patients in the progression subcohort of the OAI.

	Normalized cartilage volume in medial tibia femoral compartment			Normalized cartilage volume in central medial femoral compartment			Cartilage volume in medial tibia femoral compartment			Cartilage volume in central medial femoral compartment		
	B	SE	p-value [#]	B	SE	p-value [#]	B	SE	p-value [#]	B	SE	p-value [#]
Age	-0.011	0.003	0.001*	-0.008	0.002	<0.001*	-10.432	4.044	0.010*	-6.470	2.196	0.003*
Gender (Female)	-0.498	0.062	<0.001*	-0.294	0.042	<0.001*	-1211.529	71.933	<0.001*	-510.377	39.069	<0.001*
BMI	-0.008	0.006	0.193	-0.008	0.004	0.064	-0.34	7.543	0.964	-0.994	4.097	0.808
Haplogroup[†]												
H (n=152)	0			0			0			0		
J (n=32)	-0.239	0.120	0.047*	-0.173	0.080	0.032*	-353.483	135.435	0.009*	-191.118	74.039	0.010*
T (n=38)	0.008	0.112	0.936	0.023	0.075	0.756	-66.358	126.596	0.600	-14.524	69.205	0.840
Uk (n=95)	0.037	0.080	0.641	0.023	0.054	0.671	8.972	91.019	0.921	-6.14	49.759	0.902
Others (n=64)	-0.112	0.092	0.222	-0.067	0.062	0.276	-239.768	103.953	0.022*	-120.847	56.828	0.034*
Time (years)	-0.061	0.008	<0.001*	-0.042	0.006	<0.001*	-57.915	8.369	<0.001*	-33.201	4.979	<0.001*
Time x Haplogroup[†]												
Time x H	0			0			0			0		
Time x J	0.002	0.020	0.927	0.008	0.014	0.552	1.708	20.069	0.932	5.474	11.940	0.647
Time x T	0.043	0.019	0.023*	0.029	0.013	0.030*	45.808	18.715	0.015*	27.020	11.134	0.015*
Time x Uk	0.021	0.013	0.121	0.013	0.010	0.155	17.160	13.495	0.204	11.489	8.029	0.153
Time x Others	0.016	0.015	0.292	0.015	0.011	0.183	18.899	15.375	0.219	13.807	9.148	0.132
Mean cartilage thickness in central medial tibia femoral compartment												
B	-0.012	0.005	0.022*	-0.011	0.003	0.002*	-0.011	0.003	0.002*	-0.007	0.003	0.042*
Gender (Female)	-0.641	0.095	<0.001*	-0.481	0.063	<0.001*	-0.481	0.063	<0.001*	-0.377	0.059	<0.001*
BMI	-0.018	0.010	0.077	-0.009	0.006	0.180	-0.010	0.006	0.180	-0.013	0.006	0.029
Haplogroup[†]												
H (n=152)	0			0			0			0		
J (n=32)	-0.265	0.186	0.154	-0.226	0.121	0.062	-0.226	0.121	0.062	-0.188	0.114	0.998
T (n=38)	0.099	0.174	0.570	0.020	0.113	0.858	0.020	0.112	0.858	0.088	0.107	0.408
Uk (n=95)	0.102	0.125	0.412	0.044	0.081	0.585	0.044	0.081	0.585	0.041	0.077	0.592
Others (n=64)	-0.117	0.143	0.413	-0.105	0.093	0.260	-0.105	0.092	0.257	-0.043	0.088	0.623
Time (years)	-0.119	0.014	<0.001*	-0.064	0.009	<0.001*	-0.064	0.009	<0.001*	-0.067	0.009	<0.001*
Time x Haplogroup[†]												
Time x H	0			0			0			0		

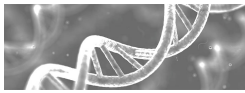


Table 4. Cont.

	Mean cartilage thickness in medial tibia femoral compartment		Mean cartilage thickness in medial tibia (anterior)		Mean cartilage thickness in medial tibia (center)		Mean cartilage thickness in central medial femoral (center)	
	B	p-value [#]	B	p-value [#]	B	p-value [#]	B	p-value [#]
Time x J	0.006	0.034	0.001	0.021	0.001	0.021	0.018	0.023
Time x T	0.081	0.032	0.045	0.019*	0.045	0.019*	0.053	0.021
Time x Uk	0.040	0.023	0.023	0.014	0.022	0.014	0.021	0.013*
Time x Others	0.028	0.026	0.020	0.016	0.020	0.016	0.017	0.015

BMI: body mass index; B: regression coefficient; SE: standard error; (†) the coefficient of each haplogroup represents the mean difference between a particular haplogroup and the reference haplogroup H at baseline; (‡) shows the interaction between the mtDNA haplogroups and the loss rate of cartilage volume and thickness over time; (‡‡) linear mixed-effects random-intercept and random-slope repeated measures analysis adjusting for gender, age and BMI at baseline and considering the most common mtDNA haplogroup, H, as the reference group; (*): indicates statistical significance at p=0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0112735.t004

therefore providing more accurate results and higher statistical power.

In summary, the results obtained in this work are of special interest because they show not only significant smaller longitudinal radiographic changes in patients carrying the mtDNA haplogroup T, but also significant lower decline in thickness and volume over time in weight bearing cartilage. A possible physiological explanation for these results, in line with what it was described above, is the mtDNA haplogroup T shows higher capacity to cope with oxidative stress than haplogroup H do [37] and oxidative stress is involved in the pathogenesis of OA [60]. This differential behavior is probably related with the origin of the mtDNA haplogroups, which are the result of a process of adaptive selection that permitted humans to adapt to colder climates when emigrated out from Africa [35,36]. Based on this theory, some of these mtDNA variants, specifically the mtDNA haplogroup H, are highly efficient in transforming the dietary calories into ATP, generating minimum heat and increased ROS; meanwhile, other mtDNA variants, such as mtDNA haplogroups T and J, are less efficient in converting dietary calories into ATP, therefore producing more heat and less ROS [61]. However, these mtDNA variants that have been critical for human adaptation to different global environments (not only temperature, but also changes in food or caloric supply, seasonal variation in climate or even infections) and would have favored survival and reproduction of populations residing in a particular climate zone might be maladaptive in a different environment with new lifestyles [62]. Hence, mtDNA haplogroups have been correlated with predisposition to a wide range of metabolic and degenerative diseases, obesity, cancers and longevity in a population-specific manner [42,63,64].

In conclusion, the results obtained in this work point to a possible role of mtDNA variation in the radiographic progression of OA and could improve identification of patients predisposed to faster or more severe progression of the disease. If further validated in additional prospective and well-characterized cohorts, the inclusion of mtDNA haplogroup assignment may also be useful for clinical trials.

Supporting Information

Figure S1 Sagittal RM images (DESSwe sequence) with the cartilage of MF being divided into cMF and pMF at 60% (left) and 75% (right) of the distance between the trochlear notch and the posterior end of the femoral condyle; MT: medial tibia; MF: medial femoral condyle; cMF: central (weight bearing) medial femoral condyle; pMF: posterior medial femoral condyle. (TIF)

Figure S2 Representative subregions of the knee used to track changes in cartilage thickness and volume. cMF: central (weight-bearing) medial femoral condyle; MT: medial tibia; cLF: central (weight-bearing) lateral femoral condyle; LT: lateral tibia; ccMF: central subregion of central (weight-bearing) medial femur; cMFTC: central medial femoro-tibial compartment; cMT: central subregion of medial tibia; aMT: anterior subregion of medial tibia. (TIF)

Table S1 Longitudinal change between baseline (T0) and 24 months (T2) in quantitative parameters of cartilage integrity (volume and thickness) grouped by mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups. (DOCX)

Table S2 Cross-sectional differences among the mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups in quantitative parameters of cartilage structure collected in an additional and different cohort

of (n = 326) knee OA patients in the progression subcohort of the OAI with no follow-up (namely Project 18). (DOCX)

Acknowledgments

We would like to thank the participants, principal investigators, co-investigators and staff of the OAI.

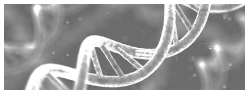
References

- Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C (2011) The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 7(3): 161–169.
- Fernandez-Moreno M, Rego I, Carreira-García V, Blanco FJ (2008) Genetics in Osteoarthritis. *Current Genomics* 9(8): 542–547.
- Valdes AM, Spector TD (2011) Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7(1): 23–32.
- Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Fernandez-Lopez C, Oreiro N et al. (2013) Mitochondrial genetics and osteoarthritis. *Front Biosci (Schol Ed)* 5: 360–368.
- Garnero P, Delmas PD (2003) Biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 15(5): 641–646.
- Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Lopez C, Arenas J, Blanco FJ (2008) Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 58(8): 2387–2396.
- Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P et al. (2004). Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatism* 50(8): 2497–2507.
- Kamarainen OP, Solovieva S, Vehmas T, Luoma K, Riihimäki H et al. (2008) Common interleukin-6 promoter variants associate with the more severe forms of distal interphalangeal osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 10(1): R21
- Attur M, Wang HY, Kraus VB, Bukowski JF, Aziz N et al. (2010) Radiographic severity of knee osteoarthritis is conditional on interleukin 1 receptor antagonist gene variations. *Ann Rheum Dis* 69(5): 856–861.
- Gillero-Pastor B, Rego-Perez I, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, Blanco FJ (2013) Mitochondrial respiratory chain dysfunction modulates metalloproteinases -1, -3 and -13 in human normal chondrocytes in culture. *BMC Musculoskelet Disord* 14: 235.
- Gavrilidis C, Miwa S, von Zglinicki T, Taylor RW, Young DA (2013) Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheumatism* 65(2): 378–387.
- Wu L, Liu H, Li L, Cheng Q, Li H et al. (2014) Mitochondrial Pathology in Osteoarthritic Chondrocytes. *Curr Drug Targets* 15(7): 710–719
- Maneiro E, Martín MA, de Andres MG, Lopez-Armada MJ, Fernandez-Suciro JL et al. (2003) Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheumatism* 48(3): 700–708.
- Gillero-Pastor B, Carames B, Lires-Dean M, Vaamonde-García C, Blanco FJ et al. (2008). Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheumatism* 58(8): 2409–2419.
- Vaamonde-García C, Riveiro-Naviera RR, Valcárcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ et al. (2012) Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheumatism* 64(9): 2927–2936.
- Kim HA, Blanco FJ (2007) Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets* 8(2): 333–345.
- Blanco FJ, Lopez-Armada MJ, Maneiro E (2004) Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* 4(5–6): 715–728.
- Henrotin Y, Kurz B (2007) Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality? *Curr Drug Targets* 8(2): 347–357.
- Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW (2009) Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 17(1): 107–113.
- Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L et al. (1996) Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144(4): 1835–1850.
- Rego I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Lopez C, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A et al. (2010) Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Ann Rheum Dis* 69(1): 210–213
- Fang H, Liu X, Shen L, Li F, Liu Y et al. (2014) Role of mtDNA haplogroups in the prevalence of knee osteoarthritis in a southern Chinese population. *Int J Mol Sci* 15(2): 2646–2659.
- Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Deberg M, Pertega S, Fernandez-Lopez C et al. (2010) Mitochondrial DNA haplogroups modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 69(5): 910–917
- Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Deberg M, Pertega S, Fernandez-Lopez C et al. (2011) Mitochondrial DNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 70(4): 646–652.
- Fernandez-Moreno M, Tamayo M, Soto-Hermida A, Mosquera A, Oreiro N et al. (2011) mtDNA Haplogroup J Modulates Telomere Length and Nitric Oxide Production. *BMC Musculoskelet Disord* 12(1): 283–289

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: IRP FJB. Performed the experiments: ASH MFM ECP NO CFL. Analyzed the data: IRP FJB SP. Contributed reagents/materials/analysis tools: ASH MFM NO CFL ECP. Wrote the paper: IRP FJB.

- Altman RD, Hochberg M, Murphy WA, Wolfe F, Lequesne M (1995) Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 3 Suppl A: 3–70.
- Eckstein F, Maschek S, Wirth W, Hudelmaier M, Hitzl W et al. (2009) One year change of knee cartilage morphology in the first release of participants from the Osteoarthritis Initiative progression subcohort: association with sex, body mass index, symptoms and radiographic osteoarthritis status. *Ann Rheum Dis* 68(5): 674–679.
- Eckstein F, Kwok CK, Boudreau RM, Wang Z, Hannon MJ et al. (2013) Quantitative MRI measures of cartilage predict knee replacement: a case-control study from the Osteoarthritis Initiative. *Ann Rheum Dis* 72(5): 707–714.
- Sun J (2006) The statistical analysis of interval-censored failure time data. New York: Springer.
- Turnbull B (1976) The empirical distribution function with arbitrarily grouped, censored and truncated data. *Journal of the Royal Statistical Society* 38: 290–295.
- Pan W (1999) Extending the iterative convex minorant algorithm to the Cox model for interval censored data. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 8: 109–120.
- Brown H, Prescott R (2006) Applied mixed models in medicine. Second Edition ed: Chichester.
- Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Pérttega-Díaz S, Oreiro N, Fernández-López C et al. (2014) Mitochondrial DNA haplogroups modulate the radiographic progression of Spanish patients with osteoarthritis. *Rheumatol Int* Epub ahead of print
- Soto-Hermida A, Fernandez-Moreno M, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, Rego-Perez I, et al. (2014) mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *Mitochondrion* 15: 18–23.
- Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG et al. (2003) Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1: 171–176.
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC (2004) Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303(5655): 223–226.
- Mueller EE, Brunner SM, Mayr JA, Stanger O, Sperl W et al. (2012) Functional differences between mitochondrial haplogroup T and haplogroup H in HEK293 hybrid cells. *PLoS One* 7(12): e52367.
- Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatounzadeh P, Ramirez C et al. (2014) Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: Implications for population susceptibility to diseases. *Biochim Biophys Acta* 1842(2): 208–219.
- Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Pavlis JM, Falatounzadeh P et al. (2013) Mitochondrial DNA variants mediate energy production and expression levels for CFH, C3 and EFEMP1 genes: implications for age-related macular degeneration. *PLoS One* 8(1): e54339.
- Hudson G, Panoutsopoulou K, Wilson I, Southam L, Rayner NW et al. (2013) No evidence of an association between mitochondrial DNA variants and osteoarthritis in 7393 cases and 5122 controls. *Ann Rheum Dis* 72(1): 136–139.
- Dominguez-Garrido E, Martinez-Redondo D, Martín-Ruiz C, Gómez-Durán A, Ruiz-Pesini E et al. (2009) Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations. *Biogerontology* 10(4): 435–442.
- Wallace DC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D (2003) mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68: 479–486.
- Herrnstadt C, Howell N (2004) An evolutionary perspective on pathogenic mtDNA mutations: haplogroup associations of clinical disorders. *Mitochondrion* 4(5–6): 791–798.
- Dato S, Passarino G, Rose G, Altomare K, Bellizzi D et al. (2004) Association of the mitochondrial DNA haplogroup J with longevity is population specific. *Eur J Hum Genet* 12(12): 1080–1082.
- Zeggini E, Panoutsopoulou K, Southam L, Rayner NW, Day-Williams AG et al. (2012) Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet* 380(9844): 815–823.
- Mazzuca SA, Brandt KD, Katz BP, Ding Y, Lane KA et al. (2006). Risk factors for progression of tibiofemoral osteoarthritis: an analysis based on fluoroscopically standardised knee radiography. *Ann Rheum Dis* 65(4): 515–519.
- Le Graverand MP, Vignon EP, Brandt KD, Mazzuca SA, Piperno M et al. (2008) Head-to-head comparison of the Lyon Schuss and fixed flexion radiographic techniques. Long-term reproducibility in normal knees and sensitivity to change in osteoarthritic knees. *Ann Rheum Dis* 67(11): 1562–1566.



48. Benichou OD, Hunter DJ, Nelson DR, Guermazi A, Eckstein F et al. (2010) One-year change in radiographic joint space width in patients with unilateral joint space narrowing: data from the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res* 62(7): 924–931.
49. Ledingham J, Regan M, Jones A, Doherty M (1993) Radiographic patterns and associations of osteoarthritis of the knee in patients referred to hospital. *Ann Rheum Dis* 52(7): 520–526.
50. Zhao D, Banks SA, D'Lima DD, Colwell CW, Fregly BJ (2007) In vivo medial and lateral tibial loads during dynamic and high flexion activities. *J Orthop Res* 25(5): 593–602.
51. Wirth W, Hellio Le Graverand MP, Wyman BT, Maschek S, Hudelmaier M et al. (2009) Regional analysis of femorotibial cartilage loss in a subsample from the Osteoarthritis Initiative progression subcohort. *Osteoarthritis Cartilage* 17(3): 291–297.
52. Wirth W, Nevitt M, Hellio Le Graverand MP, Benichou O, Dreher D et al. (2010) Sensitivity to change of cartilage morphometry using coronal FLASH, sagittal DESS, and coronal MPR DESS protocols—comparative data from the Osteoarthritis Initiative (OAI). *Osteoarthritis Cartilage* 18(4): 547–554.
53. Eckstein F, Nevitt M, Gimona A, Picha K, Lee JH et al. (2011) Rates of change and sensitivity to change in cartilage morphology in healthy knees and in knees with mild, moderate, and end-stage radiographic osteoarthritis: results from 431 participants from the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res* 63(3): 311–319.
54. Eckstein F, Wirth W, Nevitt MC (2012) Recent advances in osteoarthritis imaging—the osteoarthritis initiative. *Nat Rev Rheumatol* 8(10): 622–630.
55. Zhai G, Hart DJ, Kato BS, MacGregor A, Spector TD (2007) Genetic influence on the progression of radiographic knee osteoarthritis: a longitudinal twin study. *Osteoarthritis Cartilage* 15(2): 222–225.
56. Kerkhof HJ, Doherty M, Arden NK, Abramson SB, Attur M et al. (2011) Large-scale meta-analysis of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms on risk of radiographic hip and knee osteoarthritis and severity of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19(3): 265–271.
57. Wu X, Kondragunta V, Korinna KS, Wang HY, Duff GW et al. (2013) IL-1 receptor antagonist gene as a predictive biomarker of progression of knee osteoarthritis in a population cohort. *Osteoarthritis Cartilage* 21(7): 930–938.
58. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y et al. (2007) A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 39(4): 529–533.
59. Takahashi H, Nakajima M, Ozaki K, Tanaka T, Kamatani N et al. (2010) Prediction model for knee osteoarthritis based on genetic and clinical information. *Arthritis Res Ther* 12(5): R187.
60. Suantawee T, Tantavisut S, Adisakwattana S, Tanavalee A, Yuktanandana P et al. (2013) Oxidative stress, vitamin E, and antioxidant capacity in knee osteoarthritis. *J Clin Diagn Res* 7(9): 1855–1859.
61. Wallace DC (2013) Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368(1622): 20120267.
62. Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359–407.
63. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J et al. (2010) Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 19(17): 3343–3353.
64. Nardelli C, Labruna G, Liguori R, Mazzaccara C, Ferrigno M et al. (2013) Haplogroup T is an obesity risk factor: mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *Biomed Res Int* 631082.

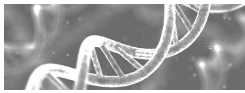
3.4 CAPÍTULO 4:

“Mitochondrial haplogroups define two phenotypes of osteoarthritis”

Resumen capítulo 4: *Mitochondrial haplogroups define two phenotypes of osteoarthritis.*

La artrosis es la principal enfermedad reumática y causa incapacidad en los pacientes que la padecen. Es además una de las principales causas de discapacidad y de bajas laborales en la sociedad actual. Acarrea unos elevados costes económicos para la sociedad además de provocar un notable deterioro en la calidad de vida de los pacientes que la sufren. Se caracteriza por afectar a todas las estructuras articulares, cartílago, hueso, además de tendones, ligamentos, membrana sinovial etc. Es una enfermedad de origen multifactorial en la que intervienen, entre otros, la edad, el sexo, la obesidad, la disminución de estrógenos en las mujeres y factores genéticos.

Tradicionalmente la artrosis se asocia, desde el punto de vista clínico, con la presencia de signos radiográficos como son la reducción del espacio articular, la presencia de osteofitos o la esclerosis de hueso subcondral. De este modo las imágenes radiográficas son la técnica de referencia en el grado de afectación de la articulación, además la presencia de dolor y la rigidez articular son considerados factores de riesgo. Sin embargo solo se suele encontrar correlación entre los síntomas articulares y las imágenes radiográficas en estados avanzados de la patología. Por eso el estudio de biomarcadores tempranos de la enfermedad es un punto clave de cara a la prevención y tratamiento de esta dolencia. Un posible biomarcador genético son los haplogrupos mitocondriales que se han relacionado con la predisposición a padecer diferentes enfermedades multifactoriales como el Alzheimer, el Parkinson o la neuropatía óptica de Leber, entre otros. En el caso de la artrosis los haplogrupos se han relacionado con la probabilidad de sufrir artrosis de rodilla y de cadera, así como con los niveles en suero de varios marcadores proteicos candidatos de artrosis. La posible explicación de estas diferencias vendría dada por las diferentes características metabólicas asociadas a cada haplogrupo. Además existe un creciente número de evidencias que ponen de manifiesto el papel de la mitocondria en el desarrollo de la enfermedad tales



como que es la principal vía apoptótica en el condrocito y los efectos inflamatorios que aparecen cuando sus complejos se ven alterados.

El objetivo de este trabajo es relacionar los pacientes artrósicos con su fenotipo mitocondrial.

Se analizaron 48 pacientes artrósicos de rodilla o cadera según los criterios del *ACR* y distribuidos de la siguiente manera: 25 pacientes portadores del haplogrupo mitocondrial J; 23 pacientes portadores del haplogrupo mitocondrial H. El grupo de controles sanos lo conformaron un total de 52 individuos, de los cuales 25 pertenecieron al haplogrupo J y 27 al haplogrupo H. Los haplogrupos se asignaron según el procedimiento descrito por Rego et al. (2008). Se recolectaron las muestras de sangre de los pacientes separando el suero de dichas muestras. En este trabajo se midieron 12 biomarcadores proteicos relacionados con la artrosis y que fueron los siguientes: metaloproteasa-1 (MMP-1); metaloproteasa-3 (MMP-3); metaloproteasa-13 (MMP-13); mieloperoxidasa (MPO); colágeno tipo II (Coll2-1) y su forma nitrada (Coll2-1NO₂); neopéptido del colágeno tipo II (C2C); propéptido del procolágeno tipo II (CPII); ácido hialurónico (HA); glicoproteína de cartílago 39 (YKL-40); proteína oligomérica de matriz de cartílago (COMP); catepsina K. A excepción de MPO, Coll2-1 y Coll2-1NO₂ que fueron determinados en un laboratorio externo, los demás marcadores se midieron en las muestras de suero a través del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*ELISA*, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Los razones entre Coll2-1NO₂/Coll2-1 y C2C/CPII se usaron también como medidas de la destrucción del cartílago mediada por el estrés oxidativo (Coll2-1NO₂/Coll2-1) y con la degradación del cartílago (C2C/CPII), respectivamente.

Los resultados de este trabajo mostraron que solo la MMP-13 presentaba unos niveles significativamente elevados en los sueros de los pacientes artrósicos, tanto para el haplogrupo H como para el haplogrupo J. Por su parte, los controles sanos portadores del haplogrupo J presentaban los niveles de MMP-3 y C2C significativamente más elevados que los pacientes artrósicos portadores del mismo haplogrupo. A través de las curvas COR se pudo discriminar entre los pacientes artrósicos y los controles sanos de cada

uno de los haplogrupos. Para el haplogrupo H los marcadores moleculares que mejor discriminaron entre pacientes artrósicos y controles sanos fueron MMP-13, Coll2-1NO₂, Coll2-1NO₂/Coll2-1, C2C/CPII y HA. Mientras que para el haplogrupo J fue la MMP-13 el único biomarcador diferencial entre ambos grupos. Puesto que la MMP-13 fue el biomarcador más consistente en todos los análisis, se realizaron las comparaciones de las curvas COR de los demás biomarcadores obteniéndose que el área bajo curva de la MMP-13 fue diferencialmente diferente con MMP-1, C2C, YKL-40 y COMP para los portadores del haplogrupo H, mientras que para los portadores del haplogrupo J fueron MMP-1, MPO, Coll2-1NO₂/Coll2-1, C2C/CPII, HA y COMP los significativamente diferentes.

Para diferenciar entre pacientes artrósicos y controles sanos se desarrolló un modelo de regresión logística (stepwise-forward) ajustado por edad, sexo y BMI. El resultado derivado de los dos modelos mostró que, para aquellos portadores del haplogrupo H, el sexo, la edad, el BMI y los niveles en suero de MMP-13 y Coll2-1 constituyen unos parámetros adecuados para realizar un diagnóstico de la enfermedad, obteniendo unos valores de AUC de 0,952 y un likelihood ratio (LR) de 18,095. En el caso del haplogrupo J, el modelo de regresión conformado por las covariables del sexo, BMI y niveles en suero de MMP-13, arrojó un valor AUC de 0,895 y un LR de 6,125.



Mitochondrial haplogroups define two phenotypes of osteoarthritis

Mercedes Fernández-Moreno¹, Angel Soto-Hermida¹, Natividad Oreiro¹, Sonia Pértega², Carlos Fenández-López¹, Ignacio Rego-Pérez^{1*} and Francisco J. Blanco^{1,2,3*}

¹ Rheumatology Division, Genomic Lab Instituto de Investigación Biomédica-Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

² CIBER-BBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³ Departamento de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Edited by:

Alexandrina Ferreira Mendes,
University of Coimbra, Portugal

Reviewed by:

Ali Mobasheri, The University of
Nottingham, UK

Elena N. Dedkova, Rush University
Medical Center, USA

*Correspondence:

Ignacio Rego-Pérez, Rheumatology
Division, Genomic Lab Instituto de
Investigación Biomédica-Hospital
Universitario A Coruña, 15006-A
Coruña, Spain.

e-mail: ignacio.rego.perez@sergas.es;

Francisco J. Blanco, Osteoarticular

and Aging Research Laboratory,

Biomedical Research Center,

Complejo Hospitalario Universitario A

Coruña, 15006-A Coruña, Spain.

e-mail: fblagar@sergas.es

Objective: To assess a mitochondrion-related phenotype in patients with osteoarthritis (OA). **Methods:** Serum levels of the following OA-related biomarkers: matrix metalloproteinase-1 (MMP-1); MMP-3; MMP-13; myeloperoxidase (MPO); a peptide of the alpha-helical region of type II collagen, Coll2-1, and its nitrated form Coll2-1NO₂; a C-terminal neopeptide generated by the collagenase-mediated cleavage of collagen type II triple helix, C2C; the C-propeptide of collagen type II, CPII; hyaluronic acid (HA); human cartilage glycoprotein 39, YKL-40; cartilage oligomeric matrix protein; and cathepsin K were analyzed in 48 OA patients and 52 healthy controls carrying the haplogroups H and J. Logistic regression models and receiver operating characteristic (ROC) curves were performed to predict the onset of OA. **Results:** MMP-13 was the only biomarker significantly increased in OA patients compared to healthy controls in both haplogroups H and J. The collagen type II biomarkers, Coll2-1, Coll2-1NO₂, the Coll2-1NO₂/Coll2-1 ratio, C2C, CPII, and the C2C:CPII ratio were significantly increased in OA patients carrying haplogroup H compared to OA carriers of the haplogroup J. Two logistic regression models for diagnosis were constructed and adjusted for age, gender, and body mass index. For haplogroup H, the biomarkers significantly associated with OA were MMP-13 and Coll2-1; the area under the curve (AUC) of the ROC curve for this model was 0.952 (95% CI = 0.892–1.012). For haplogroup J, the only biomarker significantly associated with OA was MMP-13; the AUC for this model was 0.895 (95% CI = 0.801–0.989). **Conclusion:** The mitochondrial DNA haplogroups are potential complementary candidates for biomarkers of OA; their genotyping in conjunction with the assessment of classical protein molecular markers is recommended.

Keywords: mitochondria, biomarkers, osteoarthritis, cartilage, arthritis

INTRODUCTION

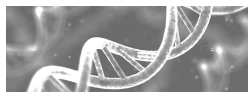
Osteoarthritis (OA), the most common form of joint disease and cause of musculoskeletal disability in elderly people, is a disease affecting articular cartilage, bone, and soft tissue leading to joint destruction and severe impairment of mobility (Felson and Zhang, 1998). It is the main cause of work incapacity and one of the most common reasons for visiting primary care physicians. Among the risk factors that play a role in OA, gender, age, behavioral influences, obesity, estrogen loss in women and genetic contribution, are notable (Felson and Zhang, 1998; Valdes et al., 2004).

OA is traditionally associated with radiographic signs of joint space narrowing, osteophyte formation, and subchondral sclerosis. Currently, the diagnosis of OA relies on the description of pain symptoms, stiffness in the affected joints and the use of radiography as the reference technique for determining the grade of joint destruction. However, radiographic signs and clinical symptoms only develop in late-stage OA when significant joint damage has already occurred (Cibere et al., 2009). Current treatment strategies are limited, being mainly based on analgesia and, in some cases, surgical procedures (Spil van et al., 2010).

Because OA affects mainly bone, cartilage, and the synovium, structural molecules derived from these tissues could be candidate biological markers for OA. Biomarkers are molecules released into biological fluids during the process of tissue biosynthesis and turnover. The target of the use of biomarkers is to detect changes arising from OA with more reliability, sensitivity, and preferably at an earlier stage of the disease (Garnero et al., 2001, 2002).

With this in mind, several groups have studied potential biomarkers for OA, with sufficiently controversial results that some authors express some limitations about their use as molecular markers for OA (Felson and Lohmander, 2009). Our group proposes new candidate genetic biomarkers, the mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups, which we suggest can be useful as complementary factors when the classical OA-related molecular markers are analyzed.

The mtDNA haplogroups have been associated with several multifactorial diseases, including Alzheimer's (van der Walt et al., 2003), Parkinson's (van der Walt et al., 2004), or Leber hereditary optic neuropathy (LHON; Torroni et al., 1997). Interestingly, we



detected a lower risk for developing knee and hip OA in carriers of the mtDNA haplogroup J in a Spanish population (Rego-Pérez et al., 2008; Rego et al., 2010) and reported that some of the mtDNA haplogroups are associated with changes in serum levels of several classical OA-related molecular markers (Rego-Pérez et al., 2010, 2011). The proposed mechanism relies on the different metabolic characteristics of these haplogroups, reflected by the performance of the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) of each haplogroup (Ruiz-Pesini et al., 2000; Gómez-Durán et al., 2010).

These findings and others strengthen the role of mitochondria in the pathogenesis of OA. A significant decrease in complex II and III activity in OA chondrocytes compared with normal chondrocytes has been demonstrated, and mitochondrial mass was also shown to be increased in OA chondrocytes (Maneiro et al., 2003). The apoptotic mitochondrial pathway has been implicated as one of the major cellular pathways of apoptosis in OA chondrocytes (Kim and Blanco, 2007). In addition, the inhibition of complexes III and V of the mitochondrial respiratory chain (MRC) causes an increased inflammatory response, which is potentially relevant to the production of prostaglandin E₂ (PGE₂) and reactive oxygen species (ROS; Cillero-Pastor et al., 2008). Mitochondrial free radical production has been shown to compromise chondrocyte function (Blanco et al., 2004; Henrotin and Kurz, 2007), causing mtDNA damage and reduced mtDNA capacity for repair (Grishko et al., 2009).

This study aims to assess a mitochondrion-related phenotype in OA patients. Logistic regression models that include the analyses of different OA-related biomarkers, mtDNA haplogroups and other clinical variables OA-related, such as gender, age, and body mass index (BMI) were performed in a population from Northern Spain.

MATERIALS AND METHODS

SUBJECTS

The population analyzed in this study has been previously described (Rego-Pérez et al., 2010). A total of 48 unrelated patients diagnosed with knee or hip OA were included in the present study, 25 carrying haplogroup J and 23 carrying haplogroup H. Patients meeting the inclusion criteria for this study included 32 females and 16 males older than 41 years-old (mean age: 68.48 ± 7.64 years-old; range: 52–95), and diagnosed with OA following the American College of Rheumatology (ACR) criteria (Altman et al., 1986). Of the 52 subjects who met the inclusion criteria for normal subjects, 25 carried haplogroup J and 27 haplogroup H. These control subjects included 27 females and 25 males older than 41 years-old (mean age: 66.5 ± 11.25 years-old; range: 42–91), who did not meet the ACR criteria for knee or hip OA. Knee and hip radiographs from all 100 subjects were classified according to the Kellgren and Lawrence (K/L) scoring system, which ranges from Grade 0 to Grade IV (Kellgren and Lawrence, 1957). The clinical variables gender, age, and BMI were collected for all subjects. In all cases, informed consent and the agreement of the ethical committee from Galician Health Administration were obtained.

mtDNA HAPLOGROUPS GENOTYPING

The samples obtained for the study were haplogroup-typed using a previously described assay (Rego-Pérez et al., 2008). For this study, only subjects carrying mtDNA haplogroups H and J were included.

MOLECULAR BIOMARKERS

Fasting blood samples were collected from each subject in plain tubes containing separation gel. These were allowed to stand for 20 min, then centrifuged for 10 min at 800 × g. The serum was then divided into aliquots and stored at –80°C pending assay.

For this study the following 12 OA-related molecular markers were measured: metalloproteinase-1 (MMP-1; interstitial collagenase, pro-enzyme), MMP-3 (stromelysin 1, active enzyme), MMP-13 (collagenase 3, active enzyme), myeloperoxidase (MPO), a denaturation epitope of the triple helical domain of collagen type II (Coll2-1) and its nitrated form (Coll2-1NO₂), a C-terminal neoepitope generated by the collagenase-mediated cleavage of collagen type II triple helix (C2C), the procollagen type II C-terminal propeptide (CPII), hyaluronic acid (HA), cartilage glycoprotein 39 (YKL-40), cartilage oligomeric matrix protein (COMP), and cathepsin K, a cysteine protease that also cleaves the triple helix of collagen type II. The determination of MPO, Coll2-1, and Coll2-1NO₂ was performed at the Bone and Cartilage Research Unit of the University of Liege (Belgium), using a previously described assay (Deberg et al., 2008). The remaining biomarkers were measured in our laboratory using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) according to the manufacturer's recommendations. Serum MMP-1 and MMP-3 levels were measured using kits from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), MMP-13 was measured using a kit from Bender MedSystems (Vienna, Austria), C2C, and CPII were measured using kits from Ibx Technologies (Montreal, QC, Canada), HA was measured using a kit from Corgenix Medical Corporation (Denver, CO, USA), YKL-40 was measured using a kit from Quidel Corporation (San Diego, CA, USA), COMP was measured using a kit from Abnova (Taipei City, Taiwan) and cathepsin K was measured using a kit from Biomedica Medizinprodukte (GmbH & Co KG Vienna, Austria).

The Coll2-1NO₂/Coll2-1 ratio was utilized as an additional measure of oxidative stress-mediated cartilage degradation, and the C2C/CPII ratio as a further index of cartilage breakdown.

The determination of the serum levels of all the biomarkers analyzed in this study was performed by simultaneously assaying OA patients and healthy controls regardless of mtDNA haplogroup.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were performed using SPSS software, release 17 (Chicago, IL, USA), and EPIDAT 3.1 (Dirección Xeral de Saúde Pública. Consellería de Sanidade. Xunta de Galicia. Santiago de Compostela, España). Haplogroups H and J were analyzed separately. A univariate analysis was performed on each of these haplogroups to compare serum levels of the biomarkers between OA patients and healthy controls using the Mann-Whitney *U*-test.

Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to analyze the ability of different molecular markers to discriminate between OA patients and healthy controls in haplogroups H and J. The area under the curve (AUC) and its 95% confidence interval

were calculated, and only those curves with an AUC ≥ 0.8 were considered as discriminative. The ROC curves for each of the biomarkers were compared using the method of DeLong et al. (1988).

Multiple logistic regression models adjusted for age, gender, and BMI were used for each haplogroup studied to determine which biomarkers are significantly associated with OA patients (diagnostic model). A forward stepwise approach was followed to construct the final models. The optimal probability cut-off was assessed by maximizing the Youden index (sensitivity + specificity - 1). For this cut-off, sensitivity, specificity, and positive likelihood ratio (LR) values were also calculated. The ROC curves resulting from the regression models were developed taking into account only significant variables.

RESULTS

A total cohort of 100 subjects, 48 OA patients, and 52 healthy controls, were included in this study; 50 were carriers of haplogroup H and 50 of haplogroup J.

UNIVARIATE ANALYSIS FOR COMPARISON OF THE TESTED MOLECULAR MARKERS

The mean values for the different molecular markers in each haplogroup, comparing OA patients and healthy controls with their corresponding *p*-values, are shown in **Table 1**. The results show that only MMP-13 is significantly increased in OA patients in either haplogroup. Most of the catabolic markers are increased in OA patients who carry haplogroup H, even when compared to OA patients that carry haplogroup J (**Table 1**; **Figure 1**). Interestingly, healthy controls carrying haplogroup J show significantly higher levels of MMP-3 and C2C than OA patients with this haplogroup. In summary, these results clearly show a different profile for some of the biomarkers in these two haplogroups.

ROC CURVES FOR THE DIAGNOSIS OF THE MOLECULAR MARKERS

The ROC curves and their corresponding AUC values for all the biomarkers were calculated. ROC curves were performed for each biomarker in each haplogroup. For carriers of haplogroup H, the most discriminative biomarkers were MMP-13, AUC value 0.869 (95% CI = 0.758–0.979), Coll2-1NO₂, 0.863 (95% CI = 0.756–0.970), Coll2-1NO₂/Coll2-1, 0.836 (95% CI = 0.719–0.953), C2C:CPII, 0.831 (95% CI = 0.718–0.944), and HA, 0.841 (95% CI = 0.727–0.955; **Table 2**). Carriers of haplogroup J had only the MMP-13 biomarker, with an AUC of 0.867 (95% CI = 0.749–0.985), able to discriminate between OA patients and healthy controls (**Table 2**).

Because MMP-13 was the most consistent biomarker in all the analyses, a comparison of the ROC curve for MMP-13 and the ROC curves for each of the other biomarkers was performed. For carriers of haplogroup H, the AUC of MMP-13 was statistically different from those of MMP-1 (*p* = 0.0008), C2C (*p* = 0.0004), YKL-40 (*p* = 0.0017), and COMP (*p* = 0.0040). For carriers of haplogroup J, the AUC of MMP-13 was statistically different from MMP-1 (*p* = 0.0005), MPO (*p* = 0.0104), Coll2-1NO₂/Coll2-1 (*p* = 0.0039), C2C:CPII (*p* = 0.0081), HA (*p* = 0.0049), and COMP (*p* = 0.0015; **Table 2**).

MULTIVARIATE LOGISTIC REGRESSION ANALYSIS FOR DIAGNOSIS OF OA

A model to discriminate between OA patients and healthy controls was developed for each of the two haplogroups to include the clinical variables gender, age, and BMI as well as the tested biomarkers.

After adjusting for age, gender, and BMI, haplogroup H carriers had biomarkers MMP-13 and Coll2-1 significantly associated with OA (**Table 3**). The AUC for this model was 0.952 (95% CI = 0.892–1.012). The optimal probability cut-off for discrimination between OA and healthy subjects was 0.536, with a sensitivity of 90%, a specificity of 95%, and a positive LR of 18.095; thus, the model discriminated very well between OA patients and healthy controls (**Figure 2A**). In summary, OA patients with haplogroup H showed higher serum levels of both MMP-13 and Coll2-1 than healthy controls with this haplogroup, as well as an increased BMI and age, regardless of gender.

After adjusting for age, gender, and BMI, patients carrying haplogroup J showed that biomarker MMP-13 was significantly associated with OA (**Table 3**). The AUC for this model was 0.895 (95% CI = 0.801–0.989). The optimal probability cut-off for discriminating between OA patients and healthy controls was 0.503, with a sensitivity of 88%, a specificity of 86%, and a positive LR of 6.125 (**Figure 2B**). In summary, OA patients with haplogroup J showed higher serum levels of MMP-13 than healthy controls with this haplogroup, as well as an increased BMI, regardless of age. This model also showed an increased risk of OA in females (**Table 3**).

DISCUSSION

This study was performed to find a mitochondrion-related phenotype in OA patients using the analysis of 12 OA-related molecular markers and two additional ratios, C2C:CPII and Coll2-1NO₂/Coll2-1. As described above, the choice of haplogroups H and J was because of the different relationships that our group previously found between the haplogroup J and the prevalence and severity of knee (Rego-Pérez et al., 2008) and hip OA (Rego et al., 2010), and because of the association of haplogroups H and J with the serum levels of collagen type II markers (Rego-Pérez et al., 2010).

In previous studies, some of the molecular markers found to be increased in OA appeared to show no differences between cases and controls (Rego-Pérez et al., 2010, 2011). This apparent discrepancy may be accounted for by the fact that the serum levels of some of these markers between cases and controls differed depending on the haplogroup carried. In this sense, we found that serum levels of Coll2-1 were (not statistically) increased in healthy controls (Rego-Pérez et al., 2010), contrarily to the findings of other investigators (Deberg et al., 2008); however, the serum levels of Coll2-1 were increased in OA patients with haplogroup H. Even OA patients that carry this haplogroup had also significantly higher serum levels of Coll2-1NO₂ than healthy controls carrying either of the haplogroups H or J, and also higher than OA patients with haplogroup J (Rego-Pérez et al., 2010). These results were strengthened by measuring the production of Nitric oxide (NO) in articular chondrocytes, showing that carriers of the mtDNA haplogroup J have lower production of NO

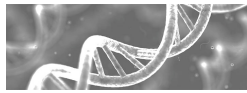


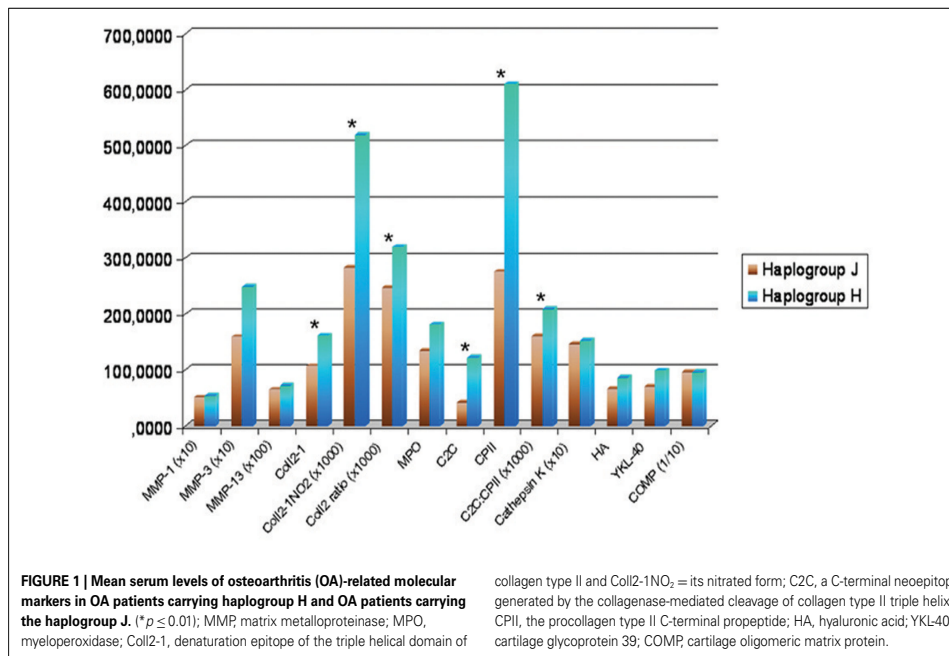
Table 1 | Univariate analysis of the biomarkers for haplogroups H and J.

Molecular marker	Haplogroup H			Haplogroup J		
	Healthy Mean ± SD (n = 23)	OA Mean ± SD (n = 27)	p*	Healthy Mean ± SD (n = 23)	OA Mean ± SD (n = 27)	p*
MMP-1 (ng/mL)	5.59 ± 4.25	5.47 ± 3.89	0.915	5.31 ± 4.30	5.13 ± 3.4	0.961
MMP-3 (ng/mL)	18.90 ± 10.79	24.89 ± 19.23	0.170	25.98 ± 13.70	15.98 ± 8.89	0.003**
MMP-13 (ng/mL)	0.56 ± 0.31	0.72 ± 0.15	<0.001**	0.48 ± 0.15	0.65 ± 0.15	<0.001**
MPO (ng/mL)	112.93 ± 85.40	181.49 ± 118.74	0.015	141.17 ± 78.73	134.06 ± 143.09	0.201
Coll2-1 (nM)	143.66 ± 33.14	161.31 ± 25.25	0.122	137.40 ± 50.05	107.78 ± 54.90	0.015
Coll2-1NO ₂ (nM)	0.33 ± 0.10	0.52 ± 0.16	<0.001**	0.34 ± 0.17	0.28 ± 0.26	0.079
Coll2-1NO ₂ /Coll2-1 (nM)	0.23 ± 0.06	0.32 ± 0.07	<0.001**	0.25 ± 0.13	0.25 ± 0.24	0.281
C2C (ng/mL)	129.29 ± 43.52	122.55 ± 37.76	0.884	72.57 ± 39.97	42.92 ± 30.72	0.006**
CPII (ng/mL)	472.48 ± 249.94	610.60 ± 211.74	0.015	393.06 ± 213.03	275.75 ± 178.57	0.067
C2C:CPII (ng/mL)	0.32 ± 0.14	0.21 ± 0.06	<0.001**	0.25 ± 0.37	0.16 ± 0.04	0.388
HA (ng/mL)	41.00 ± 32.52	86.13 ± 45.71	<0.001**	59.56 ± 39.37	66.48 ± 35.56	0.438
YKL-40 (ng/mL)	110.55 ± 89.62	99.57 ± 73.54	0.793	116.63 ± 103.20	71.00 ± 38.21	0.073
COMP (ng/mL)	992.68 ± 540.79	963.67 ± 266.49	0.490	1040.34 ± 562.51	959.64 ± 484.14	0.808
Cathepsin K (pmol/L)	13.24 ± 22.44	15.31 ± 16.85	0.026	14.14 ± 21.94	14.60 ± 22.53	0.123

SD, Standard deviation.

*Mann-Whitney non-parametric U-test.

**Statistical significance declared at p < 0.01 due to multiple comparisons.



than non-J carriers (Fernández-Moreno et al., 2011). It is known that OA chondrocytes produce NO (Henrotin et al., 1993; Karan et al., 2003) and that the effect of NO on chondrocyte survival is mediated by its effect on the MRC (Maneiro et al., 2005). It is

also known that Coll2-1NO₂ is an indicator of the oxidative stress status of the chondrocyte (Deberg et al., 2008), thereby suggesting that chondrocytes of haplogroup J carriers may have less oxidative stress.

Table 2 | Comparative analysis of the receiver operating characteristic (ROC) curves of biomarkers for haplogroups H and J.

Molecular marker	Haplogroup H			Haplogroup J		
	AUC	95% CI	p*	AUC	95% CI	p*
MMP-1 (ng/mL)	0.509	0.345–0.673	0.0008**	0.504	0.340–0.961	0.0005**
MMP-3 (ng/mL)	0.614	0.457–0.770	0.0185	0.747 [#]	0.609–0.885	0.2001
MMP-13 (ng/mL)	0.869	0.758–0.979		0.867	0.749–0.985	
MPO (ng/mL)	0.705	0.558–0.851	0.0505	0.607 [#]	0.446–0.767	0.0104**
Coll2-1 (nM)	0.628	0.472–0.784	0.0155	0.701 [#]	0.548–0.854	0.0905
Coll2-1NO ₂ (nM)	0.863	0.756–0.970	0.9465	0.645 [#]	0.484–0.806	0.0279
Coll2-1NO ₂ /Coll2-1 (nM)	0.836	0.719–0.953	0.6711	0.589 [#]	0.425–0.753	0.0039**
C2C (ng/mL)	0.488	0.324–0.651	0.0004**	0.726 [#]	0.579–0.874	0.1258
CPII (ng/mL)	0.700	0.552–0.849	0.0662	0.651 [#]	0.497–0.806	0.0162
C2C:CPII (ng/mL)	0.831[#]	0.718–0.944	0.0895	0.571 [#]	0.409–0.733	0.0081**
HA (ng/mL)	0.841	0.727–0.955	0.7668	0.564	0.401–0.727	0.0049**
YKL40 (ng/mL)	0.522	0.359–0.684	0.0017**	0.648 [#]	0.494–0.802	0.0253
COMP (ng/mL)	0.557	0.395–0.719	0.0040**	0.520 [#]	0.357–0.683	0.0015**
Cathepsin K (pmol/L)	0.684	0.535–0.834	0.0443	0.627	0.466–0.788	0.0132

AUC, area under the curve. Values in bold indicate the most discriminative (AUC ≥ 0.8). CI, confidence interval.

[#]Lower values of the biomarker are associated with OA in carriers of this haplogroup.

[#]Test for homogeneity of areas comparing the AUC from the MMP-13 from those of the other molecular markers.

**Statistical significance declared at p < 0.01 due to multiple comparisons.

Table 3 | Multivariate logistic regression analysis for diagnosis of osteoarthritis (OA) in haplogroup H and J carriers.

Variables	B	OR	95% CI	p*
HAPLOGROUP H				
Age	0.263	1.301	1.026–1.649	0.030**
BMI	0.647	1.910	1.124–3.244	0.017**
MMP-13	0.430	1.537	1.023–2.310	0.038**
Coll2-1	0.104	1.110	1.013–1.217	0.026**
HAPLOGROUP J				
BMI	0.404	1.499	1.062–2.115	0.021**
Gender	–1.930	0.145	0.026–0.816	0.028**
MMP-13	0.551	1.735	1.017–2.959	0.043**

B = regression coefficient.

OR, odd ratio.

CI, confidence interval.

*p-Value from the logistic regression model.

**Statistical significance declared at p ≤ 0.05.

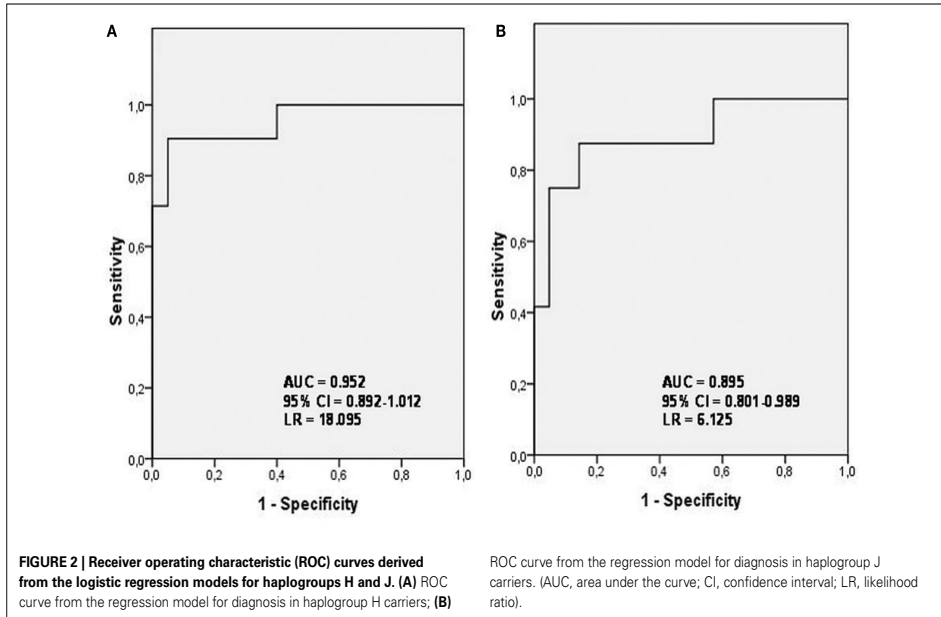
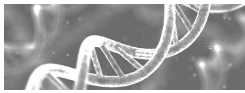
We believe that the explanation for these discrepant results is related to mtDNA haplogroups. The frequency of distribution of haplogroups in our cohort is substantially different from that observed in typical cohorts, which will follow the distribution of these haplogroups in the general population: haplogroup H 40–47% and haplogroup J 7–12% (Torroni et al., 1996; Dahmany et al., 2006). The frequency distribution in our cohort was the same for each haplogroup. We see that the results derived from the analysis of carriers of haplogroup H, the most common haplogroup in Caucasian populations, are more in line with those obtained by other authors, and reflect the fact that serum levels of most of the

catabolic OA-related biomarkers are increased in haplogroup H carriers, as shown in Figure 1.

In this study, pursuant to the analyses of the ROC curves and univariate analysis, MMP-13 was the only molecular marker that differentiated between OA patients and healthy controls in carriers of both haplogroups H and J, as previously described by others (Reboul et al., 1996; Rego-Pérez et al., 2011). In this sense, a role for the mitochondrial dysfunction in the expression of the MMPs has also been proposed (Cillero-Pastor et al., 2008, 2010).

Other molecular markers that have been proposed for differentiating between OA patients and healthy controls, such as HA (Elliott et al., 2005; Mazières et al., 2006), appear to be increased in OA patients, but only significantly increased in haplogroup H carriers with OA. HA has been reported to be increased in OA patients in some studies and was proposed as a surrogate marker with predictive value for radiographic progression of OA (Mazières et al., 2006; Filková et al., 2009). Our study shows that this association is stronger in haplogroup H carriers (Table 1). Because the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 (IL-1) is one of the main cytokines involved in the mitochondrial dysfunction and in the OA disease, we speculate that this association could be due to different effects of the IL-1, which is an important factor in the synovial production of HA (Nishida et al., 2000), on cells with different mitochondrial backgrounds.

The regression model of diagnosis for haplogroup H carriers shows that, together with both the BMI and age, those subjects with higher serum levels of MMP-13 and Coll2-1 are more likely to be diagnosed with OA. This model resulted in extraordinary LR and AUC values, hence discriminating very well between OA patients and healthy controls. On the other hand, the model for haplogroup J carriers shows that, together with both the BMI and gender, subjects with higher serum levels of MMP-13 only are more

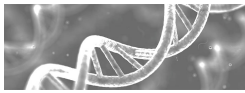


likely to be diagnosed as having OA, therefore do not appearing any other biomarker in this model significantly associated to discriminate between OA patients and healthy controls. In summary, these findings highlight the importance of the mitochondrial background in the OA disease, since Coll2-1 appeared significantly increased in OA patients with the mtDNA haplogroup H, but not in patients with the haplogroup J, probably by the fact that haplogroup H carriers have more active collagen type II metabolism than haplogroup J carriers do, as proposed in our previous work (Rego-Pérez et al., 2010). Because mtDNA haplogroups H and J are clearly biochemically different (Wallace, 1999), the possible differences in OXPHOS performance between them (Ruiz-Pesini et al., 2000; Martínez-Redondo et al., 2010) could explain the more active metabolism in haplogroup H carriers; hence CPII levels in OA patients with haplogroup H are higher than in healthy controls or OA patients with haplogroup J (Rego-Pérez et al., 2010), which may represent an attempt to repair OA damaged cartilage by increasing the synthesis of collagen type II, as previously described (Aigner et al., 1992; Lohmander et al., 1996; Nelson et al., 1998). Similarly, metabolic differences between these two haplogroups could account for our finding that most of the catabolic collagen type II biomarkers are increased in OA patients who carry haplogroup H, when compared with OA patients who carry haplogroup J.

REFERENCES

- Aigner, T., Stöss, H., Weseloh, G., Zeiler, G., and von der Mark, K. (1992). Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 62, 337–345.
- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T. D., Greenwald, R., Hochberg, M., Howell, D., Kaplan, D., Koopman, W., Longley, S. I. I., Mankin, H., Meshane, D. J., Medsger, T. J. R., Meenan, R., Mikkelsen, W., Mqschwitz, R., Murphy, W., Rothschild, B., Segal, M., Sokoloff, L., and Wolfe, F. (1986). Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 29, 1039–1049.

- Blanco, F. J., López-Armada, M. J., and Maneiro, E. (2004). Role of mitochondria and osteoarthritis. *Mitochondrion* 4, 715–728.
- Cibere, J., Zhang, H., Garnero, P., Poole, A. R., Lobanok, T., Saxne, T., Kraus, V. B., Way, A., Thorne, A., Wong, H., Singer, J., Kopec, J., Guermazi, A., Peterfy, C., Nicolaou, S., Munk, P. L., and Esdaile, J. M. (2009). Association of biomarkers with pre-radiographically defined and radiographically defined knee osteoarthritis in a population-based study. *Arthritis Rheum.* 60, 1372–1380.
- Cillero-Pastor, B., Caramés, B., Lires-Deán, M., Vaomonde-García, C., Blanco, F. J., and López-Armada, M. J. (2008). Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 58, 2409–2419.
- Cillero-Pastor, B., Rego, I., López-Armada, M. J., and Blanco, F. J. (2010). The dysfunction of mitochondrial respiratory chain regulates the metalloproteinases expression in human normal chondrocytes in culture. *Osteoarthr. Cartil.* 18, S109.
- Dahmany, Y., Marcuello, A., Montiel-Sosa, F. J., Montoya, J., and Sánchez, C. D. (2006). Mitochondrial lineages distribution in the Spanish population: anticipating association studies. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 72, 37–47.
- Deberg, M., Dubuc, J. E., Labasse, A., Sanchez, C., Quettier, E., Bosseloir, A., Crieleard, J.-M., and Henrotin, Y. (2008). One-year follow-up of Coll2-1, Coll2-1NO₂ and myeloperoxidase serum levels in osteoarthritis patients after hip or knee replacement. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 168–174.
- DeLong, E. R., DeLong, D. M., and Clarke-Pearson, D. L. (1988). Comparing the areas under two or more correlated receiver operating curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 44, 837–845.
- Elliott, A. L., Kraus, V. B., Luta, G., Stabler, T., Renner, J. B., Woodard, J., Dragomir, A. D., Helmick, C. G., Hochberg, M. C., and Jordan, J. M. (2005). Serum Hyaluronan levels and radiographic knee and hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians in the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum.* 52, 105–111.
- Felson, D. T., and Lohmander, L. S. (2009). Whither osteoarthritis biomarkers? *Osteoarthr. Cartil.* 17, 419–422.
- Felson, D. T., and Zhang, Y. (1998). An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum.* 41, 1343–1355.
- Fernández-Moreno, M., Tamayo, M., Soto-Hermida, A., Mosquera, A., Oreiro, N., Fernández-López, C., Fernández, J. L., Rego-Pérez, I., and Blanco, F. J. (2011). mtDNA haplogroup J modulates telomere length and nitric oxide production. *BMC Musculoskelet. Disord.* 12, 283. doi:10.1186/1471-2474-12-283
- Filková, M., Senolt, S., Braun, M., Hulejová, H., Pavelková, A., Sléglová, O., Kupka, K., Gatterová, J., and Pavelka, K. (2009). Serum hyaluronic acid as a potential marker with a predictive value for further radiographic progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 17, 1615–1619.
- Garnero, P., Ayral, X., Rouseau, J. C., Christgau, S., Sandell, L. J., Dougados, M., and Delmas, P. D. (2002). Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 2613–2624.
- Garnero, P., Piperno, M., Gineyts, E., Christgau, S., Delmas, P., and Vignon, E. (2001). Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann. Rheum. Dis.* 60, 619–626.
- Gómez-Durán, A., Pacheu-Grau, D., López-Gallardo, E., Díez-Sánchez, C., Montoya, J., López-Pérez, M., and Ruiz-Pesini, E. (2010). Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3343–3353.
- Grishko, V. I., Ho, R., Wilson, G. L., and Pearsall, A. W. IV. (2009). Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 17, 107–113.
- Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., Deby, C., De Bruyn, M., Lamy, M., and Franchimont, P. (1993). Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes. *Br. J. Rheumatol.* 32, 562–567.
- Henrotin, Y., and Kurz, B. (2007). Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality? *Curr. Drug Targets* 8, 347–357.
- Karan, A., Karan, M. A., Vural, P., Erten, N., Tascioglu, C., Aksoy, C., Canbaz, M., and Oncel, A. (2003). Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin. Rheumatol.* 22, 397–399.
- Kellgren, J. H., and Lawrence, J. S. (1957). Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 16, 494–502.
- Kim, H. A., and Blanco, F. J. (2007). Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr. Drug Targets* 8, 333–345.
- Lohmander, S. Y., Yoshihara, Y., Roos, H., Kobayashi, T., Yamada, H., and Shinmei, M. (1996). Pro-collagen II c-propeptide in joint fluid: changes in concentrations with age, time after joint injury and osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 23, 1765–1769.
- Maneiro, E., López-Armada, M. J., de Andres, M. C., Caramés, B., Martín, M. A., Bonilla, A., del Hoyo, P., Galdo, F., Arenas, J., and Blanco, F. J. (2005). Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 388–395.
- Maneiro, E., Martín, M. A., de Andres, M. C., López-Armada, M. J., Fernández-Sueiro, J. L., del Hoyo, P., Galdo, F., Arenas, J., and Blanco, F. J. (2003). Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 48, 700–708.
- Martínez-Redondo, D., Marcuello, A., Casajús, J. A., Ara, I., Dahmani, Y., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E., López-Pérez, M. J., and Díez-Sánchez, C. (2010). Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO₂max consumer. Is it a paradox? *Mitochondrion* 10, 102–107.
- Mazières, B., Garnero, P., Guéguen, A., Abbal, M., Berdah, L., Lequesne, M., Nguyen, M., Salles, J. P., Vignon, E., and Dougados, M. (2006). Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. The ECHODIAH Cohort. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 354–359.
- Nelson, F., Dahlberg, L., Laverty, S., Reiner, A., Pidoux, I., Ionescu, M., Fraser, G. L., Brooks, E., Tanzer, M., Rosenberg, L. C., Dieppe, P., and Robin Poole, A. (1998). Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* 102, 2115–2125.
- Nishida, Y., D'Souza, A. L., Thonar, E. J., and Knudson, W. (2000). Stimulation of Hyaluronan metabolism by interleukin-1alpha in human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 43, 1315–1326.
- Reboul, P., Pelletier, J. P., Tardif, G., Cloutier, J. M., and Martel-Pelletier, J. (1996). The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* 97, 2011–2019.
- Rego, I., Fernández-Moreno, M., Fernández-López, C., Gómez-Reino, J. J., González, A., Arenas, J., and Blanco, F. J. (2010). The role of European mtDNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia (Northern Spain). *Ann. Rheum. Dis.* 69, 210–213.
- Rego-Pérez, I., Fernández-Moreno, M., Deberg, M., Perteiga, S., Fernández-López, C., Oreiro, N., Henrotin, Y., and Blanco, F. J. (2010). Mitochondrial DNA haplogroups modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 910–917.
- Rego-Pérez, I., Fernández-Moreno, M., Deberg, M., Perteiga, S., Fernández-López, C., Oreiro, N., Henrotin, Y., and Blanco, F. J. (2011). mtDNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 646–652.
- 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, 2387–2396.
- Ruiz-Pesini, E., Lapeña, A. C., Díez-Sánchez, C., Pérez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Diaz, M., Urriés, A., Montoro, L., López-Pérez, M. J., and Enriquez, J. A. (2000). Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatzoa motility. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 682–696.
- Spil van, W. E., DeGroot, J., Lems, W. F., Oostveen, J. C., and Lafeber, F. P. (2010). Serum and urinary biochemical markers for knee and hip osteoarthritis: a systematic review applying the consensus BIPED criteria. *Osteoarthr. Cartil.* 18, 605–612.
- Torrioni, A., Huoponen, K., Francalacci, P., Petroski, M., Morelli, L., Scozzari, R., Obinu, D., Savontaus, M. L., and Wallace, D. C. (1996). Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144, 1835–1850.
- Torrioni, A., Petroski, M., D'Urbano, L., Sellitto, D., Zeviani, M., Carrara, F., Carducci, C., Leuzzi, V., Carelli, V., Barboni, P., De Negri, A., and Scozzari, R. (1997). Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in



- the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1107–1121.
- Valdes, A. M., Hart, D. J., Jones Ka Surdulescu, G., Swarbrick, P., Doyle, D. V., Schafer, A. J., and Spector, T. D. (2004). Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 2497–2507.
- van der Walt, J. M., Dementieva, Y. A., Martin, E. R., Scott, W. K., Nicodemus, K. K., Kroner, C. C., Welsh-Bohmer, K. A., Saunders, A. M., Roses, A. D., Small, G. W., Schmechel, D. E., Murali Doraiswamy, P., Gilbert, J. R., Haines, J. L., Vance, J. M., and Pericak-Vance, M. A. (2004). Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci. Lett.* 365, 28–32.
- van der Walt, J. M., Nicodemus, K. K., Martin, E. R., Scott, W. K., Nance, M. A., Watts, R. L., Hubble, J. P., Haines, J. L., Koller, W. C., Lyons, K., Palwa, R., Stern, M. B., Colcher, A., Hiner, B. C., Jankovic, J., Ondo, W. G., Allen, F. H. Jr., Goetz, C. G., Small, G. W., Mastaglia, F., Stajich, J. M., McLaurin, A. C., Middleton, L. T., Scott, B. L., Schmechel, D. E., Pericak-Vance, M. A., and Vance, J. M. (2003). Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 804–811.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482–1488.
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Received: 10 March 2012; paper pending published: 22 March 2012; accepted: 17 April 2012; published online: 11 May 2012.
- Citation: Fernández-Moreno M, Soto-Hermida A, Oreiro N, Pértega S, Fernández-López C, Rego-Pérez I and Blanco FJ (2012) Mitochondrial haplogroups define two phenotypes of osteoarthritis. *Front. Physiol.* 3:129. doi: 10.3389/fphys.2012.00129
- This article was submitted to *Frontiers in Striated Muscle Physiology*, a specialty of *Frontiers in Physiology*. Copyright © 2012 Fernández-Moreno, Soto-Hermida, Oreiro, Pértega, Fernández-López, Rego-Pérez and Blanco. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.

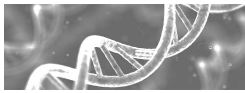
IV. DISCUSIÓN

4.1 Discusión capítulo I: *mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations.*

Estudios previos, sobre cohortes de pacientes españolas, han puesto de manifiesto que el haplogrupo mitocondrial J tiene una influencia importante como factor protector en la artrosis ^{278,279}. Esta asociación se ve reforzada en el presente trabajo llevado a cabo sobre una cohorte ampliada y actualizada de pacientes españoles; sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no muestran ninguna asociación entre la artrosis y el haplogrupo J en la cohorte de pacientes del Reino Unido, pero sí se ha encontrado en esta cohorte que el haplogrupo T presenta una menor frecuencia en los pacientes artrósicos. En este trabajo se ha comparado el haplogrupo T frente a todos los demás pacientes que no portan este haplogrupo para poder comparar estos resultados con otros datos ya publicados.

Los haplogrupos J y T comparten un origen filogenético común ²⁴⁹ y diferentes estudios apoyan la idea de que estos dos haplogrupos se caracterizan por la presencia de mutaciones desacoplantes que, en combinación con el trasfondo nuclear, provocan una menor producción de *ATP* ^{282,318} y como consecuencia una reducción en la generación de *ROS* ^{245,246,249,277}. La posible explicación a esta asociación específica de la población puede tener su origen en el hecho de que estas variantes mitocondriales podrían representar una ventaja en diferentes condiciones ambientales, como se ha descrito en otros casos ^{253,319}. En el caso de este estudio, las diferencias ambientales pueden tener su origen en los diferentes patrones climáticos que existían en el momento de la introducción, desde Oriente próximo, de los haplogrupos J y T en Europa durante el inicio del último periodo glacial, representando la zona franco-cantábrica el principal refugio para las migraciones humanas ^{319,320}. Este hecho es además relevante por el hecho de que las migraciones más importantes, después de la era glacial, tuvieron lugar desde este refugio glacial hacia el Norte de Europa, incluido el Reino Unido³¹⁹.

Los resultados de este trabajo no concuerdan exactamente con los del estudio de asociación más extenso llevado a cabo hasta el momento y en el que



se analizaron 7393 pacientes artrósicos pertenecientes al consorcio arcOGEN y 5122 controles asintomáticos de la enfermedad provenientes del *Wellcome Trust Case Control Consortium 2* ²⁸⁶. Sin embargo, como proponen los autores del trabajo, la explicación a no encontrar una asociación significativa con ningún haplogrupo puede deberse a que la contribución relativa de los haplogrupos mitocondriales puede variar entre diferentes grupos étnicos, posiblemente debido a interacciones con factores medioambientales y diferentes genes nucleares ²⁴⁹. Además hay que tener en cuenta que los controles de este estudio son controles asintomáticos y el porcentaje de personas sin síntomas de artrosis de rodilla pero que sí posee signos radiográficos puede llegar a ser superior al 50% ⁴⁷.

Para intentar clarificar las discrepancias relativas al haplogrupo J entre ambas poblaciones, incluidas las diferencias en las distribuciones de los haplogrupos entre ambas cohortes control, secuenciamos el genoma mitocondrial completo de 6 muestras del Reino Unido y 6 muestras de la cohorte española portadoras del haplogrupo J (subtipo J1c) y además también se estudiaron dos importantes polimorfismos del haplogrupo J, el m.14798t>c y el m.15257g>a, relacionados con la eficiencia de sistema *OXPHOS* ²⁴⁶. Como resultado de este análisis se encontraron diferencias en la distribución de algunos polimorfismos relacionados con el haplogrupo J entre ambas poblaciones y basándose en estos resultados seleccionamos el polimorfismo m.3394t>c para ser analizado en ambas cohortes ya que este polimorfismo es una de las mutaciones secundarias asociadas a la enfermedad de *LHON* ³²¹. En relación a este polimorfismo, algunos estudios han analizado su incidencia en varias patologías, como la arritmia cardíaca ³²², la diabetes ³²³, la cardiomiopatía ³²⁴ o el síndrome de muerte súbita infantil ³²⁵, todos ellos relacionados con la deficiencia de *ATP*; además este polimorfismo también se ha asociado con un menor consumo de oxígeno ³²⁶. Estas dos últimas características, baja producción de *ATP* y bajo consumo de Oxígeno, se relacionan con el haplogrupo J ^{245,283,327}, representado a su vez la principal causa del efecto protector en algunas enfermedades degenerativas y/o asociadas al

estrés oxidativo ^{257,278}, así como su mayor frecuencia en la población anciana ^{250,253,319,328}.

Diferentes autores, basándose en el análisis de las secuencias del ADNmt, apuntan hacia una importante heterogeneidad en la distribución de frecuencias del haplogrupo J y sus subtipos desde su introducción en Europa ^{319,320,329,330}, y esto podría explicar, al menos en parte, la diferente composición genética de este haplogrupo entre España y el Reino Unido, y consecuentemente su diferente comportamiento en ambas poblaciones.

En resumen, a pesar de que la asociación original descrita en la población española no ha sido replicada en la población inglesa, el haplogrupo T aparece como un factor protector frente a la artrosis en la cohorte del Reino Unido. Este haplogrupo, con el haplogrupo J, se caracteriza por presentar mutaciones de desacoplamiento mitocondrial las cuales, en combinación con el trasfondo nuclear, provocan que cada uno de estos haplogrupos aparezca como ventajoso en cada una de estas poblaciones. La diferente composición genética del haplogrupo J entre España y Reino Unido puede deberse a la heterogeneidad de este haplogrupo cuando se introdujo en Europa, dando lugar a polimorfismos diferenciales, como el m.3394t>c. Sin embargo, es necesario secuenciar una población mayor de muestras de España y Reino Unido para validar estos resultados preliminares y analizar la frecuencia de los polimorfismos diferenciales del haplogrupo J entre ambas poblaciones lo que permitiría explicar la discrepancia del haplogrupo J en estas dos poblaciones caucásicas.

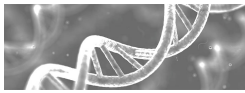
4.2 Discusión capítulo 2: *Mitochondrial DNA haplogroups modulate the radiographic progression of Spanish patients with osteoarthritis.*

En este trabajo, se utilizó el incremento en el grado *KL* para analizar la influencia de los haplogrupos mitocondriales en la progresión radiográfica en una cohorte retrospectiva de 281 pacientes artrósicos del Hospital Universitario de A Coruña; se registró y se considero como un resultado de la progresión la implantación de una prótesis articular. El uso del grado *KL* para evaluar la progresión en artrosis ya ha sido descrito en otros estudios ³³¹. El periodo de seguimiento de 36 meses concuerda también con el utilizado en trabajos previos sobre progresión en artrosis ^{332,333}.

A fin de compensar la baja frecuencia de algunos haplogrupos en la población europea ³³⁴, los análisis se llevaron a cabo utilizando clústers mitocondriales así como ser o no portador del haplogrupo H. La comparación entre los portadores del haplogrupo H y los que no lo son permitió examinar los efectos del haplogrupo Europeo más común, que ha mostrado un comportamiento diferencial al resto de haplogrupos en otros estudios ^{255,280,283}. Por otra parte, en el trabajo se han incluido en los análisis muestras de rodilla y/o cadera debido a la idéntica relación encontrada por nuestro grupo entre los haplogrupos y las artrosis de rodilla y cadera en dos estudios independientes ^{278,279}.

Para minimizar los sesgos de información durante la evaluación de las radiografías con las que determinar la progresión, las radiografías fueron examinadas por personal cualificado que desconocía cualquier información clínica de los pacientes. Además, para controlar las posibles variables de confusión se llevó a cabo un análisis de regresión múltiple de Cox que nos permitió analizar la influencia de los haplogrupos mitocondriales en la progresión de la enfermedad, después de ajustar por otros factores no genéticos como la edad, el sexo o el BMI.

Nuestros resultados muestran que los haplogrupos influyen en la progresión radiográfica de artrosis. Los pacientes pertenecientes al clúster TJ tuvieron una progresión en artrosis más lenta que los pertenecientes al clúster



Uk, y los pacientes portadores del haplogrupo H mostraron una mayor tendencia hacia una progresión más rápida que los que no son H, además de ser los que más probabilidades tienen de alcanzar, con mayor rapidez, una prótesis articular. Estos resultados están en la línea de trabajos previos en los que los portadores del haplogrupo H mostraron unos mayores niveles de biomarcadores catabólicos de artrosis en suero que los de los otros haplogrupos ^{280,281}. Puesto que este estudio solo evalúa la progresión radiográfica de pacientes artrósicos no podemos concluir que los portadores del haplogrupo H tengan una mayor probabilidad de inicio de desarrollar artrosis en comparación con el resto de haplogrupos; sin embargo, teniendo en cuenta estudios previos de nuestro grupo, la distribución de frecuencias de este haplogrupo entre pacientes artrósicos y controles sanos no presentó diferencias significativas ^{278,279}. Esto indica que durante la evolución de la artrosis este haplogrupo progresa más rápido que el resto de haplogrupos, siendo preciso la colocación de una prótesis articular también más rápidamente.

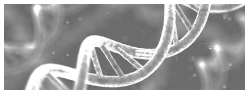
Para encontrar una explicación a estos hallazgos debemos tener en cuenta las importantes diferencias bioquímicas que el haplogrupo H tiene con respecto a los demás haplogrupos ²⁵⁵. Este haplogrupo presenta un alto nivel de aminoácidos conservados y probablemente debido a esto posee la mayor eficiencia de acoplamiento de OXPHOS y de producción de ATP ^{245,276,282}. Además algunos autores han encontrado que este haplogrupo es también el que más oxígeno consume ²⁸³; sin embargo, estos resultados no fueron replicados en un reciente trabajo de *Larsen et al.* ³³⁵ probablemente debido a que en el máximo consumo de oxígeno participan muchos otros factores no controlados en el primer trabajo. Sin embargo, estos hechos están acompañados por un aumento en la producción de ROS y un incremento en el daño celular y la apoptosis ^{249,276}. Debido a que la producción de ROS es uno de los factores importantes implicados en la artrosis ³³⁶, los altos niveles de producción de ROS encontrados en el haplogrupo H pueden ser la razón por la que los portadores de este haplogrupo tengan una mayor predisposición a

progresar en la artrosis lo que les lleva a someterse antes a una cirugía de reemplazo articular.

Por el contrario, los haplogrupos J y T (clúster TJ) muestran claras diferencias bioquímicas con respecto al haplogrupo H ³²¹, presentando una menor eficiencia de acoplamiento de OXPHOS, una menor producción de *ATP* y consumo de oxígeno y una menor producción de *ROS* ^{276,282,337}. Además, el haplogrupo T posee una mejor capacidad para combatir el estrés oxidativo que el haplogrupo H ³³⁷. Estas características estarían detrás de que el clúster TJ no solo sea el que tenga menos predisposición a desarrollar artrosis de rodilla ²⁷⁸ si no que además muestre una progresión más lenta de la enfermedad.

Los resultados de este trabajo contrastan con el reciente trabajo de Hudson et al. en el que no encuentran evidencias de asociación entre haplogrupos y artrosis ²⁸⁶. Sin embargo, algunos puntos a tener en cuenta podrían explicar esta discrepancia: primero, las muestras control de la cohorte arcOGEN solo son asintomáticas y sin información radiográfica; segundo, como postulan los autores, la contribución relativa de los haplogrupos podría variar en diferentes grupos étnicos debido a la homoplasia y/o las diferencias geográficas en el detalle pormenorizado de las estructuras de los subhaplogrupos mitocondriales ²⁸⁶; tercero, como describen los autores en su manuscrito, el estudio de genoma completo llevado a cabo por el consorcio arcOGEN no fue capaz de replicar la asociación con otros genes previamente descritos como el *GDF5*, el cromosoma 7q22 y *MCF2L* ¹⁵⁴.

Una parte de la variación clínica que presentan las diferentes variantes de artrosis se atribuye al componente genético ³³⁸. Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan el rol de la genética, incluida la mitocondrial, en la artrosis como se describió previamente ^{339,340}. Sin embargo, hasta el momento se sabe poco acerca de la incidencia de los factores genéticos en la progresión de la enfermedad. Estudios previos llevados a cabo por otros investigadores muestran que las variantes genéticas de los genes del receptor antagonista de la interleucina 1 (*IL1RN*) ^{341,342} o de la proteína de la capa intermedia de cartílago (*CILP*) entre otros ³⁴³ influyen en la severidad y la progresión de la artrosis. Específicamente, el polimorfismo funcional situado en la región 5'-



UTR del gen del factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF5) se ha asociado con la susceptibilidad a padecer artrosis y formó parte de un modelo de predicción de artrosis de rodilla basado en información genética y clínica ^{135,344}. En resumen, los datos experimentales sugieren que una combinación de variantes genéticas de diferentes genes puede incrementar el riesgo de artrosis; esto podría identificar a pacientes con elevado riesgo de sufrir la enfermedad ^{344,345}, así como pacientes con predisposición a una rápida progresión de la misma.

En este trabajo es necesario aclarar algunos puntos. Primero, en este estudio se incluyeron pacientes diagnosticados como artrósicos de rodilla o cadera de los cuales existían al menos dos radiografías con un periodo de seguimiento no inferior a 36 meses; así pues, los pacientes artrósicos con solo una radiografía no fueron incluidos en el estudio. Este sesgo podría llevar a una sobrestimación de la incidencia de la progresión en artrosis de los pacientes supervisados. Segundo, el incremento en el grado KL puede tener lugar en cualquier momento entre dos radiografías consecutivas, lo que podría llevar a una sobrestimación del tiempo necesario para que ocurra la progresión radiográfica. Finalmente, a pesar de que el grado radiográfico de un paciente artrósico se define normalmente como $KL \geq 2$, en este estudio, hemos incluido a pacientes con $KL = 1$ en el inicio del estudio; sin embargo, la distribución inicial de grados KL entre los haplogrupos o clusters no mostró diferencias significativas. No obstante, estos sesgos afectan por igual a todos los haplogrupos, por tanto las diferencias encontradas en este estudio corresponden a diferencias reales en la probabilidad de progresión entre haplogrupos.

En resumen, el objetivo de este trabajo fue analizar la influencia de los haplogrupos mitocondriales en la progresión en la artrosis en una cohorte retrospectiva de pacientes artrósicos. Los hallazgos más notables de este trabajo son que los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo europeo más común H son más propensos a necesitar una prótesis articular frente a los portadores de otros haplogrupos, y aquellos pacientes pertenecientes al clúster TJ muestran una progresión de artrosis más lenta que los pertenecientes al

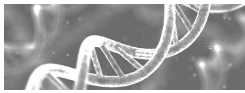
clúster Uk teniendo en cuenta el empeoramiento en el grado *KL*. Sin embargo, dado el límite de significación de estos valores y para tener en cuenta los haplogrupos mitocondriales entre otras variantes genéticas a tener en cuenta cuando se está intentando identificar pacientes con alto riesgo de padecer progresión radiográfica en artrosis, estos resultados deben ser replicados en una cohorte independiente.

4.3 Discusión capítulo 3: *Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups influence the progression of knee osteoarthritis. Data from the Osteoarthritis Initiative (OAI).*

Hasta el momento este es el primer estudio en el que se analiza la influencia de los factores genéticos en la progresión de la artrosis en la cohorte de prospectiva de la *OAI*. Más específicamente este trabajo intenta analizar la influencia de los haplogrupos mitocondriales en la progresión de la artrosis de rodilla. Los resultados obtenidos revelan que los pacientes de la subcohorte de progresión portadores del haplogrupo T no solo muestran una menor probabilidad acumulada de progresión en cuanto al grado *KL*, sino que además manifiestan una menor reducción de espacio articular, menor presencia de osteofitos y menor desarrollo de esclerosis de hueso subcondral en la zona medial de la tibia. Estos resultados se vieron reforzados después de analizar la pérdida de integridad del cartílago durante un periodo de dos años mostrando cómo los portadores del haplogrupo T sufrían una reducción significativamente menor de grosor y volumen .

Estudios previos llevados a cabo en una cohorte española mostró que los pacientes con haplogrupos pertenecientes al clúster TJ presentaban una progresión en artrosis significativamente más lenta en cuanto al grado *KL* ³⁴⁶. Además, en un trabajo previo de asociación entre haplogrupos y prevalencia de artrosis de rodilla en una población española se demostró que, dentro del clúster TJ había una mayor frecuencia de controles sanos radiológicos de rodilla frente a pacientes con artrosis ²⁷⁸. Esta asociación fue parcialmente replicada sobre una cohorte de pacientes artrósicos de cadera de la misma localización geográfica, mostrando una asociación del haplogrupo J con una menor prevalencia de artrosis de cadera ²⁷⁹. Además, en otro trabajo reciente, el haplogrupo T aparece sobrerrepresentado en la cohorte de sana de rodilla de pacientes de Reino Unido después de realizar un modelo de regresión en el que se ajustó por sexo y edad ³⁴⁷.

Hasta la fecha, el presente estudio es el primero y más completo en donde se estudian los haplogrupos y la progresión en la artrosis usando la



cohorte de la *OAI*; los resultados obtenidos no deberían ser interpretados como discrepantes en relación a hallazgos previos, no solo porque este trabajo no analiza la asociación entre los haplogrupos y la prevalencia de la enfermedad, sino porque además ambos haplogrupos, J y T, , son considerados haplogrupos “hermanos” que comparten el mismo origen filogenético (el clúster TJ) ^{245,249} que incluye la presencia de polimorfismos comunes. Estos polimorfismos pueden ser los responsables del carácter desacoplante del sistema *OXPPOS* que presentan estos haplogrupos, el cual, , en combinación con el trasfondo nuclear, hace que posean unas características funcionales en su sistema *OXPPOS* como la disminución de la producción de *ATP* y la reducción de las *ROS* ^{276,277,337}.

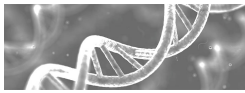
Un trabajo reciente de Hudson et al. no encontró evidencias de relación entre los haplogrupos y la prevalencia en artrosis ²⁸⁶. Sin embargo, algunos puntos podrían explicar estas diferencias; primero, como postulan los autores, la contribución relativa de los haplogrupos podría variar en los diferentes grupos étnicos por efecto de la homoplasmia y/o diferencias geográficas en las estructuras de los subhaplogrupos ²⁸⁶. En este sentido, las asociaciones específicas poblacionales de los haplogrupos, probablemente debidas a interacciones con factores medioambientales ²⁵³ como adaptación a climas fríos ^{245,246,249}, han sido también descritas ^{348,349}; segundo, como los autores describen en su manuscrito, el estudio de asociación de genoma completo llevado a cabo por el consorcio arcOGEN tampoco replicó otros estudios de asociación sobre genes relacionados con la artrosis como *GDF5*, el cromosoma 7q22y *MCF2L* ¹⁵⁴; tercero, los controles del consorcio arcOGEN son solo sintomáticos sin información radiográfica, la selección adecuada de los controles sanos para estudios de asociación con artrosis es un punto crucial para poder extraer conclusiones satisfactorias.

El riesgo de progresión estructural en una rodilla que no presenta de inicio ningún tipo de reducción del espacio articular (no-*JSN*) es alto cuando la rodilla contralateral sí presenta una reducción importante del espacio articular (*JSN*); por ello algunos autores sugieren que la rodilla no-*JSN* podría ser la rodilla diana en ensayos clínicos ya que, , aunque presente menos daño que una rodilla *JSN*, sí puede desarrollar una progresión significativa debido a la

presencia de la rodilla contralateral con *JSN* ^{350,351}. En base a ello, y con el fin de evaluar la viabilidad de una medicación en los ensayos clínicos, hemos cuantificado la anchura de espacio articular siguiendo una aproximación similar a la realizada por Benichou et al. ³⁵². Los resultados mostraron que los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo T tienen una menor tasa de progresión estructural en las rodillas no-*JSN*. Estos resultados recomiendan tener en consideración a los haplogrupos mitocondriales cuando se lleven a cabo ensayos clínicos en esta población.

El compartimento medial de la rodilla es el que soporta las mayores cargas y la artrosis de rodilla afecta más frecuentemente a este compartimento que al lateral ^{353,354}; por lo tanto el análisis de las imágenes de resonancia llevados a cabo en este trabajo se realizaron en las regiones/subregiones previamente caracterizadas entre las más sensibles a cambios en la artrosis de rodilla: el compartimento central medio tibio-femoral y el compartimento medial tibio-femoral ^{66,316,355-357}, así como otras regiones de interés como el cóndilo femoral central medio y la tibia medial (anterior). La conclusión que se extrae del análisis de estos datos es que los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo T mostraron una disminución significativamente menor de grosor y volumen de cartílago en el tiempo en estas subregiones del compartimento medial.

Un aspecto clave de la variación que tiene lugar a nivel de las diferentes manifestaciones clínicas de la artrosis es la genética ³³⁸. En relación con la progresión de la artrosis, trabajos previos de otros investigadores han encontrado que las variantes genéticas de algunos genes, como *IL1RN* o *CILP*, influyen en la severidad y la progresión de la enfermedad ^{341,342,358}. Un polimorfismo funcional en la región 5'-UTR del gen *GDF5* se ha asociado de manera consistente con la susceptibilidad a padecer artrosis y ha formado parte de un modelo de predicción para artrosis de rodilla basado en información clínica y genética ^{135,344}. Los resultados de este trabajo fortalecen la implicación de los factores genéticos, incluido el genoma mitocondrial, en la artrosis como se ha descrito previamente ^{339,340}.



Este estudio posee algunos puntos que necesitan ser aclarados: i) en relación a los factores de confusión, los análisis fueron realizados ajustando por potenciales factores de confusión como la edad, el sexo, el *BMI* y, en la progresión radiográfica, las cirugías previas y el peor grado radiológico en el tiempo inicial del estudio. Otros factores de predicción sobre la prevalencia o la progresión en artrosis, como las lesiones en la médula ósea o las lesiones de menisco, fueron también analizados pero finalmente no se tuvieron en cuenta por el pequeño número de pacientes con estos datos. Por otra parte, ii) una de las fortalezas de este estudio es el análisis llevado a cabo; el uso del análisis de datos por intervalos de censura para determinar la probabilidad de progresión en la artrosis de rodilla según el haplogrupo evita sesgos asociados al uso de los análisis de supervivencia en este contexto. Además, el uso de modelos lineales mixtos en el análisis de los datos de las imágenes de resonancia magnética nos permite tener en cuenta todos los datos disponibles para un paciente a lo largo del tiempo, proporcionando de esta manera unos resultados más precisos y un mayor poder estadístico.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo son de especial interés debido a que muestran no solo menores cambios radiográficos longitudinales en paciente portadores del haplogrupo T, sino que además presentan disminuciones de grosor y volumen de cartílago significativamente menores a lo largo del tiempo en la zona de zona de mayor carga para el cartílago. Una posible explicación fisiológica para estos resultados, en concordancia con lo expuesto anteriormente, es que el haplogrupo T posee una mayor capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo que el haplogrupo H^{337,359}, proceso implicado en el desarrollo de la artrosis,. Este comportamiento diferente estaría relacionado con el origen de los haplogrupos mitocondriales, que son el resultado de procesos de selección adaptativa que permitieron a los humanos adaptarse a los climas fríos cuando emigraron desde África^{245,249}. Basándose en esta teoría, algunas de estas variantes mitocondriales, especialmente el haplogrupo H, son más eficientes al transformar las calorías ingeridas en la dieta en *ATP*, generando menos calor y más *ROS*; mientras que otras variantes mitocondriales, como los haplogrupos T y J, son menos

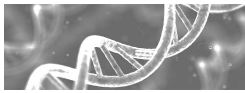
eficientes convirtiendo las calorías consumidas a través de la dieta en *ATP*, de manera que producen más calor y menos *ROS* ³⁶⁰. Sin embargo, estas variantes mitocondriales que han sido críticas para la adaptación a los diferentes variaciones ambientales (no solo de temperatura, sino también a cambios en el suplemento calórico alimenticio, variaciones estacionales del clima o incluso infecciones) y que podrían haber favorecido la supervivencia y la reproducción de las poblaciones establecidas en regiones climáticas particulares pueden suponer una mala adaptación en un ambiente diferente con diferentes estilos de vida ¹⁹¹. Por esto, los haplogrupos mitocondriales han sido relacionados con la predisposición a sufrir una amplia variedad de enfermedades metabólicas y degenerativas, obesidad, diferentes tipos de cáncer y con la longevidad dependiente de la población ^{246,255,361}.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo apuntan hacia un posible rol de los haplogrupos en la progresión radiológica de la artrosis y podrían mejorar la identificación de pacientes con predisposición a progresar más rápida y severamente en la enfermedad. Si esto es validado en otras cohortes prospectivas bien caracterizadas, la inclusión de la asignación de los haplogrupos de los pacientes podría ser también útil en los ensayos clínicos.

4.4 Discusión capítulo 4: *Mitochondrial haplogroups define two phenotypes of osteoarthritis.*

Este trabajo se realizó con la intención de encontrar posibles fenotipos mitocondriales relacionados con los pacientes artrósicos utilizando el análisis de 12 potenciales biomarcadores proteicos relacionados con la artrosis y adicionalmente dos razones entre 4 de ellos, C2C/CPII y Coll2-1NO₂/Coll2-1. Como se describe en el artículo, la elección de los haplogrupos H y J se debió a las relaciones que nuestro grupo había encontrado previamente entre el haplogrupo J y la prevalencia y severidad en las artrosis de rodilla y cadera ^{278,279}, además de la asociación de los haplogrupos H y J con los diferentes niveles en suero de marcadores del colágeno tipo II ²⁸⁰.

En estudios previos, algunos de los biomarcadores que se han encontrado incrementados en la artrosis no muestran diferencias entre casos y controles ^{280,281}. Esta aparente discrepancia puede deberse a que los niveles en suero entre casos y controles de algunos de estos biomarcadores sólo muestran diferencias en función del haplogrupo al que pertenecen. En este sentido, nosotros encontramos que los niveles en suero de Coll2-1 estaban incrementados en los controles sanos ²⁸⁰ (diferencia no estadísticamente significativa), contrariamente a los trabajos de otros investigadores ³⁶²; sin embargo, los niveles en suero de Coll2-1 estaban incrementados en pacientes artrósicos portadores del haplogrupo H. Incluso los pacientes artrósicos portadores de este haplogrupo tuvieron también niveles de Coll2-1NO₂ significativamente mayores que los de los controles sanos ya pertenecieran al haplogrupo H o al haplogrupo J, siendo además mayores que los de los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo J ²⁸⁰. Estos resultados se vieron reforzados con la medición de la producción de óxido nítrico (*NO*, del inglés *nitric oxide*) en condrocitos articulares humanos en cultivo, mostrando que los portadores del haplogrupo J tenían una menor producción de *NO* que los portadores de haplogrupos no-J ²⁸⁴. Se sabe que los condrocitos artrósicos producen *NO* ^{363,364} y el efecto de este sobre la supervivencia del condrocito está mediado por su efecto sobre la cadena de transporte electrónico ³⁶⁵.



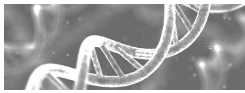
También se sabe que el Coll2-1NO₂ es un indicador del estado de estrés oxidativo del condrocito ³⁶², de modo que estos resultados indicarían que los condrocitos portadores del haplogrupo J deben sufrir un menor estrés oxidativo.

La distribución de frecuencias de los haplogrupos en nuestra cohorte es sustancialmente diferente de la observada en otras cohortes típicas, que siguen la distribución de haplogrupos de la población general: haplogrupo H 40-47% y haplogrupo J 7-12% ³³⁴. La distribución de frecuencias en nuestra cohorte fue la misma para cada haplogrupo. Por lo tanto, se observa que los resultados derivados de los análisis de los portadores del haplogrupo H, el haplogrupo más común dentro de la población Caucásica, se encuentran más en la línea de los obtenidos por otros autores, y refleja el hecho de que los niveles en suero de la mayoría de biomarcadores catabólicos de artrosis están incrementados en los portadores del haplogrupo H, como muestra la figura 1.

En este estudio, conforme a los análisis de las curvas ROC y del modelo univariante, MMP-13 fue el marcador molecular que diferenció entre pacientes artrósicos y controles sanos en ambos haplogrupos H y J, como previamente describieron otros autores ^{281,366}. En este sentido se ha propuesto también el rol de la disfunción mitocondrial en la expresión de las metaloproteasas ²³⁹. Otros marcadores que han sido propuestos para diferenciar entre pacientes artrósicos y controles sanos, como el HA ^{367,368}, parecen estar incrementados en pacientes artrósicos, pero solo están significativamente incrementados en pacientes artrósicos portadores del haplogrupo H. En algunos estudios se ha citado que el HA se encuentra incrementado en los pacientes artrósicos y ha sido propuesto como un marcador de progresión radiográfica en artrosis con valor predictivo ^{368,369}. Nuestro trabajo muestra que esta asociación es más fuerte en los portadores del haplogrupo H (Tabla 1). Debido a que la citocina pro-inflamatoria IL-1 es una de las principales citocinas implicadas en la disfunción mitocondrial en la patología artrósica, especulamos con que esta asociación podría ser debida a diferentes efectos de la IL-1, la cual es un factor muy importante en la producción sinovial de HA ³⁷⁰, en células con diferente trasfondo mitocondrial.

El modelo de regresión de diagnóstico para los portadores del haplogrupo H mostró que, junto con el BMI y la edad, aquellos sujetos con mayores niveles en suero de MMP-13 y Coll2-1 tienen más probabilidades de ser diagnosticados de artrosis. Este modelo obtuvo unos valores muy buenos de coeficiente de probabilidad (*LR*, del inglés *Likelihood Ratio*) y de área bajo la curva (*AUC*, del inglés *Area Under Curve*), por lo que discrimina muy bien entre pacientes artrósicos y controles sanos. Por otro lado, el modelo para los portadores del haplogrupo J muestra que, junto con el *BMI* y el sexo, los sujetos con unos niveles en suero más elevados de MMP-13 tienen más probabilidades de ser diagnosticados de artrosis. En resumen, estos hallazgos resaltan la importancia del trasfondo mitocondrial en la artrosis, el Coll2-1 aparece significativamente incrementado en pacientes artrósicos portadores del haplogrupo H, pero no en pacientes J, probablemente por el hecho de que los pacientes H poseen un metabolismo de colágeno tipo II más activo que los pacientes J, como proponemos en un trabajo anterior ²⁸⁰. Debido a que los haplogrupos H y J son bioquímicamente diferentes ³²¹, las posibles diferencias a nivel de OXPHOS entre ellos ^{282,283} podrían explicar el metabolismo más activo de los portadores del haplogrupo H; puesto que los niveles de CPII en los pacientes artrósicos con haplogrupo H son mayores que en los controles sanos y que en los pacientes artrósicos con haplogrupo J ²⁸⁰, esto podría representar un intento de reparación del cartílago artrósico dañado mediante el incremento en la síntesis de colágeno tipo II, como se ha descrito previamente ³⁷¹⁻³⁷³. De un modo similar, las diferencias metabólicas entre estos dos haplogrupos podrían explicar en nuestros resultados que la mayoría de los biomarcadores catabólicos de colágeno tipo II estén incrementados en los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo H, cuando se comparan sus valores con los de pacientes artrósicos portadores del haplogrupo J.

Como conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo son de especial interés porque refuerzan el rol de la mitocondria en el proceso artrósico. El metabolismo mitocondrial, condicionado por los haplogrupos, podrían explicar algunos de los resultados más controvertidos obtenidos en otros estudios cuando se analizan los mismos biomarcadores en diferentes

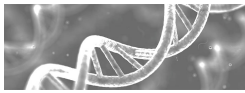


poblaciones de pacientes. Una ventaja a destacar de este estudio es el hecho notable de que los pacientes con el haplogrupo H muestran mayores niveles de marcadores catabólicos en artrosis que aquellos pacientes portadores del haplogrupo J, definiéndose claramente dos fenotipos mitocondriales diferentes de artrosis. Comprender la influencia del trasfondo mitocondrial puede permitirnos detectar mejores biomarcadores relacionados con la artrosis, y a su vez diseñar modelos de diagnóstico basados en los haplogrupos mitocondriales.

4.5 Discusión general:

La artrosis es una enfermedad compleja en donde se ven afectadas todas las estructuras que componen la articulación ²¹ y al igual que en otras patologías de origen multifactorial el inicio, la progresión y la severidad de la misma se ve modificada por múltiples factores extrínsecos e intrínsecos, factores ambientales, hormonales y en cada paciente se ven implicados múltiples genes ³⁷⁴. Por tanto, la identificación del componente genético en las enfermedades complejas, como la artrosis, es de gran relevancia, ya que permite aportar nuevos datos a la fisiopatología de la enfermedad, proporcionar nuevos elementos de diagnóstico y prevención así como identificar nuevas dianas terapéuticas ^{375,376}. En los 4 capítulos que componen esta tesis se ha relacionado parte de este componente genético, en este caso los haplogrupos mitocondriales, con el proceso artrósico tanto a nivel de prevalencia de la patología, capítulo 1, como de evolución o progresión de la misma, capítulos 2 y 3, así como la influencia sobre los mecanismos moleculares que actúan en la enfermedad a través de las alteraciones en los niveles en suero de diferentes biomarcadores relacionados con la artrosis, capítulo 4.

A pesar de que los condrocitos tienen un metabolismo principalmente glucolítico, la mitocondria se ha relacionado con la artrosis a través de diferentes mecanismos ^{340,377}. La influencia de la mitocondria sobre la enfermedad se relaciona, además de con el componente de generación de *ATP*, con el hecho de que es la principal fuente de producción de *ROS* a nivel celular y su importante papel sobre la regulación del proceso de apoptosis en el condrocito ³⁷⁶. Existen evidencias sobre modelos animales en artrosis que nos indican que un desequilibrio en la presencia de *ROS* juega un papel clave en el inicio del proceso de la articulación y en la patofisiología de la artrosis ³⁷⁸. Además, los datos de diferentes experimentos *ex vivo* sobre humanos, junto con modelos animales y experimentos *in vitro*, indican que los daños mitocondriales y la ruta de apoptosis tienen un rol muy importante en la artrosis ²³⁷. En este sentido, los resultados obtenidos en los trabajos que

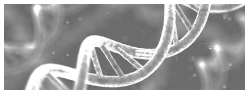


componen los capítulos de esta tesis muestran que los haplogrupos J y T, que poseen un origen filogenético común ²⁴⁹, se comportan como factores protectores en la artrosis. Los trabajos de diferentes autores en los que se utilizaron híbridos mitocondriales portadores de los haplogrupos H, J y T han permitido observar las diferentes características metabólicas inherentes a cada uno de ellos ^{314,337,379}. De este modo, cabe destacar que los haplogrupos J y T muestran una menor eficiencia en el acoplamiento de la cadena de transporte electrónico y consecuentemente una menor producción energética en forma de *ATP* ^{282,318} así como una menor producción de *ROS* ^{245,246,249,277}, de gran importancia en los procesos de muerte y degradación celular en el cartílago, si los comparamos con el haplogrupo H, el mayoritario en la población caucásica. Las diferencias a nivel metabólico en el comportamiento de los haplogrupos H y J podrían deberse a la diferente composición nucleotídica que presentan estos haplogrupos, especialmente a nivel de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico. Estos complejos forman, con el complejo IV, un supercomplejo que es la principal fuente de producción de ROS celular. Las diferencias en la composición nucleotídica que caracterizan a ambos haplogrupos inducirían variaciones en la producción de *ATP*, pérdida de electrones así como una producción diferencial de *ROS* entre ambos haplogrupos ³⁸⁰. Además, en el caso del haplogrupo T, a las características que comparte con el J hay que añadir el hecho de que posee una mayor capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo en comparación con el haplogrupo H ³³⁷. En el caso del haplogrupo J el trabajo de *Fernandez-Moreno et al.* pone de manifiesto que este haplogrupo se ve expuesto a un menor estrés oxidativo debido a que presenta unos menores niveles de producción de óxido nítrico y muestra un menor acortamiento a nivel telomérico ²⁸⁴. A esto hay que añadir el hecho de que los haplogrupos influyen en los niveles de expresión de genes nucleares relacionados con diferentes rutas metabólicas, de inflamación y de inmunidad. Estas diferencias fueron observadas en estudios realizados *Kenney et al.* utilizando híbridos portadores de los haplogrupos H y J. Así los portadores del haplogrupo J muestran una expresión diferencial en genes relacionados con

procesos inmunitarios, de inflamación y de apoptosis al comparar sus valores con los de los portadores del haplogrupo H ^{276,314}.

En los trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo se mostró una asociación clara entre el haplogrupo J y un menor riesgo de desarrollar artrosis. Asimismo, en los capítulos de esta tesis se refuerza, en algunos casos, esa asociación con otros aspectos relacionados con la enfermedad. Sin embargo, en la cohorte de prevalencia del Reino Unido y en la cohorte prospectiva Norteamericana del OAI, descritas en los capítulos 1 y 3 respectivamente, la asociación es parcialmente diferente. En ambas cohortes, el haplogrupo que se manifiesta como más beneficioso, ya sea a nivel de prevalencia de la enfermedad como a nivel de una progresión más lenta de la misma, es el haplogrupo T. Las diferencias observadas en estos estudios con respecto a los trabajos previos^{278,279} pueden deberse a componentes específicos de la población de estudio ³⁸¹. Existen en este sentido una serie de factores asociados a la población de estudio, como la distribución de los subhaplogrupos y otros factores como el estilo de vida, la procedencia étnica o los factores medioambientales que pueden ser la causa de las diferencias observadas en los resultados obtenidos en diversos trabajos ^{349,382}. De este modo, hay trabajos que muestran que la prevalencia de la artrosis de cadera depende del origen étnico, ya que los pacientes de ascendencia europea presentan una mayor prevalencia que los pacientes de ascendencia no europea ³⁸³. Otro factor que puede jugar un importante papel en que se produzcan estas diferencias entre haplogrupos y poblaciones es el genoma nuclear. Así, en la intercomunicación núcleo-mitocondria se sabe de la existencia de mutaciones nucleares que afectan al metabolismo mitocondrial ya sea a través de la alteración de los complejos que conforman la cadena de transporte electrónico o de otras funciones clave para el correcto funcionamiento de la mitocondria ³⁸⁴⁻³⁸⁶.

Los resultados obtenidos en los capítulos 2 y 3 muestran que los haplogrupos mitocondriales no solo influyen en la prevalencia de la artrosis sino que además también lo hacen sobre la progresión de la misma, otorgando una mayor o menor predisposición a una evolución rápida del proceso degenerativo de la articulación. Estos resultados podrían tener su explicación



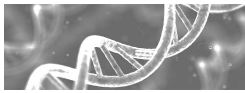
en el hecho de que el menor estrés oxidativo al que se ven sometidos los portadores de los haplogrupos J y T hace que el avance de la degeneración de las estructuras articulares sea más lento que en el caso del haplogrupo H, el cual se relaciona con un mayor consumo de oxígeno, mayor generación de *ATP*, sobreproducción de *ROS* y diferentes niveles de expresión relacionados con procesos inflamatorios, inmunitarios y de apoptosis ^{249,256,283}. Además, teniendo en cuenta que la artrosis es una enfermedad asociada al envejecimiento, diferentes trabajos sobre la asociación de los haplogrupos con la longevidad muestran que el haplogrupo J se asocia con una mayor longevidad en diferentes poblaciones de raza caucásica ^{253,349,387}. Del mismo modo, la posible explicación a esta excepcional característica residiría en la presencia de un menor estrés oxidativo asociado al haplogrupo mitocondrial J.

Existen evidencias de que la diversidad en el ADNmt se ha producido por un efecto de adaptación climática, más que por un mecanismo aleatorio de transmisión genética entre las diferentes generaciones, ya que las mutaciones en algunos genes mitocondriales muestran una elevada especificidad geográfica ³⁸¹. Este efecto se observa en la distribución geográfica de los haplogrupos mitocondriales así como en la variabilidad nucleotídica de los genes *ATP6*, *CytB* y *COI*, como demuestra el trabajo de *Mishmar et al.* en el que después de comparar las secuencias de ADNmt de muestras procedentes de zonas árticas, templadas y tropicales, encuentran que el gen *ATP6* presenta una variabilidad elevada en las muestras procedentes de la zona ártica, mientras que los genes *CytB* y *COI* muestran una variabilidad en sus secuencias notablemente mayor en las zonas templada y tropical, respectivamente ²⁴⁵. La selección genética promovida en las poblaciones europeas para la supervivencia en climas fríos podría haber provocado la selección de variantes genéticas con una mayor producción de calor que permitirían una mejor adaptación a las condiciones ambientales. Por el contrario, en las zonas tropicales los polimorfismos genéticos seleccionados fueron los que favorecieron la generación de energía en detrimento de la producción de calor, maximizando el uso de las calorías consumidas en el trabajo físico ^{249,388}. De acuerdo con estas teorías, la selección climática de las diferentes variantes

mitocondriales habría llevado a una variación en la eficiencia del acoplamiento del sistema OXPHOS según el haplogrupo portado. Sin embargo existen autores que no están de acuerdo con esta teoría ya que por un lado no han encontrado diferencias significativas entre haplogrupos de origen nórdico y haplogrupos de zonas más cálidas en cuanto a la eficiencia de acoplamiento de la cadena de transporte electrónico ³⁸⁹ y por otro diferentes trabajos basados en análisis filogenéticos de ADNmt no han encontrado asociación con la influencia de la selección climática ³⁹⁰⁻³⁹².

Las diferencias metabólicas observadas entre los diferentes haplogrupos se manifiestan a nivel clínico en las variaciones de los niveles en suero de un conjunto de potenciales biomarcadores proteicos relacionados con la artrosis, y que corresponde al capítulo 4 de esta tesis. En este trabajo se observó la existencia de dos fenotipos mitocondriales de pacientes artrósicos, ya que los pacientes portadores del haplogrupo H mostraron unos niveles de marcadores moleculares catabólicos de artrosis significativamente más elevados que los portadores del haplogrupo J. Estos resultados siguen la línea de los obtenidos por Rego-Perez et al. en un trabajo en el que comparan los niveles en suero de biomarcadores de colágeno tipo II entre pacientes artrósicos y controles sanos portadores de los haplogrupos mitocondriales H, U y J. Los resultados obtenidos mostraron que los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo J presentaban unos niveles significativamente menores de biomarcadores de degradación de cartílago que los portadores del haplogrupo H ²⁸⁰. Además en otro estudio en el que se evaluaron los niveles en suero de diferentes enzimas proteolíticos se demostró que los portadores del haplogrupo J presentaron unos niveles más bajos de MMP-3 y MMP-13 ²⁸¹.

Uno de los principales retos con los que se encuentra la medicina en la artrosis es la búsqueda de biomarcadores tempranos de riesgo ya que el diagnóstico de la misma se produce normalmente en etapas avanzadas de la enfermedad. En la actualidad no existe ningún biomarcador aceptado e implantado a nivel clínico, además los tratamientos que existen para combatir la artrosis se centran en conseguir un efecto paliativo del dolor y las molestias inherentes a la patología así como intentar frenar o ralentizar su progresión



siendo en último termino el reemplazo articular la solución final. Los trabajos que forman parte de esta tesis muestran que la determinación de los haplogrupos mitocondriales pueden representar un firme biomarcador en la artrosis no solo a nivel de riesgo de padecerla sino que además proporcionan información sobre la progresión de la misma, actuando como biomarcadores pronóstico, y esto es de gran importancia a nivel clínico para el posible desarrollo y aplicación de tratamientos efectivos y personalizados adecuados a cada paciente.

V. CONCLUSIONES

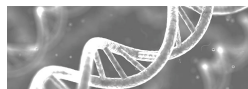
CONCLUSIONES

1. Los haplogrupos mitocondriales se asocian con la prevalencia de artrosis de rodilla y cadera en la población española y de rodilla en la población del Reino Unido.
2. El haplogrupo J tiene un efecto protector para el desarrollo de la artrosis de rodilla y cadera en la población española.
3. El haplogrupo T tiene un efecto protector para el desarrollo de la artrosis de rodilla en la población del Reino Unido.
4. Las diferencias en la composición genética del haplogrupo J entre las cohortes española y del Reino Unido se manifiestan a través de la presencia de polimorfismos relacionados con dicho haplogrupo como el m.3394t>c.
5. Los haplogrupos mitocondriales son útiles para identificar la predisposición de los pacientes para presentar una progresión radiográfica más rápida en la artrosis.
6. Los pacientes con el haplogrupo T presentan una tasa más lenta de progresión radiográfica de la enfermedad así como una menor pérdida de volumen y grosor de cartílago en el tiempo medido con RM.
7. Los haplogrupos influyen en la tasa de progresión radiográfica de artrosis, siendo el clúster TJ el que presenta una progresión más lenta dentro de la cohorte de estudio española, mientras que los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo H son los que presentan una mayor predisposición a sufrir una prótesis articular.
8. Los haplogrupos definen dos fenotipos mitocondriales en los pacientes artrósicos, los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo H muestran unos niveles séricos más elevados de marcadores catabólicos de artrosis que los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo J.

VI. BIBLIOGRAFÍA

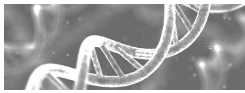
BIBLIOGRAFÍA

1. Dequeker J, Luyten FP. The history of osteoarthritis-osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(1):5-10.
2. Benedek TG. When did "osteo-arthritis" become osteoarthritis? *J Rheumatol.* 1999;26(6):1374-1376.
3. Moodie RL. THE PALEOPATHOLOGY OF THE FOSSIL INVERTEBRATES. *Science.* 1923;57(1464):85.
4. Braunstein EM, White SJ, Russell W, Harris JE. Paleoradiologic evaluation of the Egyptian royal mummies. *Skeletal Radiol.* 1988;17(5):348-352.
5. Moskowitz RW, Pun Y, Haqqi TM. Genetics and osteoarthritis. *Bull Rheum Dis.* 1992;41(1):4-6.
6. Ackerknecht EH. Paleopathology. *Anthropology today: an encyclopedic inventory.* 1953:120-126.
7. STRAUS WL, CAVE JE. Pathology and the posture of Neanderthal man. *Q Rev Biol.* 1957;32(4):348-363.
8. Benedek TG. A history of the understanding of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(3):203-209.
9. Heberden W. *Commentaries on the History and Cure of Diseases.* Payne and Foss; 1816.
10. KELLGREN JH, MOORE R. Generalized osteoarthritis and Heberden's nodes. *Br Med J.* 1952;1(4751):181-187.
11. KELLGREN JH, LAWRENCE JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1957;16(4):494-502.
12. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum.* 2008;58(1):26-35.
13. Felson DT. The current and future status of biomarkers in osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2014;41(5):834-836.
14. Dieppe P, Kirwan J. The localization of osteoarthritis. *Br J Rheumatol.* 1994;33(3):201-203.
15. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(11):625-635.
16. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet.* 2011;377(9783):2115-2126.
17. Lotz M, Martel-Pelletier J, Christiansen C, et al. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(11):1756-1763.
18. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1697-1707.
19. Conaghan PG, Kloppenburg M, Schett G, Bijlsma JW, committee Eoah. Osteoarthritis research priorities: a report from a EULAR ad hoc expert committee. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(8):1442-1445.
20. Felson DT. Osteoarthritis: Priorities for osteoarthritis research: much to be done. *Nat Rev Rheumatol.* 2014.
21. Blanco FJ. Osteoarthritis: something is moving. *Reumatol Clin.* 2014;10(1):4-5.
22. de Reumatología SE. *Monografías SER.* Ed. Médica Panamericana.
23. Aigner T, Stöve J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1569-1593.



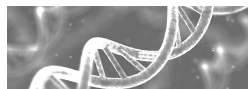
24. Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklemler Hastalik Cerrahisi*. 2010;21(1):2-14.
25. Burr DB, Gallant MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(11):665-673.
26. Felson DT. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*. 2006;354(8):841-848.
27. Neogi T. Clinical significance of bone changes in osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2012;4(4):259-267.
28. Petersson IF, Boegård T, Dahlström J, Svensson B, Heinegård D, Saxne T. Bone scan and serum markers of bone and cartilage in patients with knee pain and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998;6(1):33-39.
29. Petersson IF, Boegård T, Svensson B, Heinegård D, Saxne T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. *Br J Rheumatol*. 1998;37(1):46-50.
30. Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):43-49.
31. Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Berthiaume MJ, et al. Correlation between bone lesion changes and cartilage volume loss in patients with osteoarthritis of the knee as assessed by quantitative magnetic resonance imaging over a 24-month period. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(5):683-688.
32. Pouders C, De Maeseneer M, Van Roy P, Gielen J, Goossens A, Shahabpour M. Prevalence and MRI-anatomic correlation of bone cysts in osteoarthritic knees. *AJR Am J Roentgenol*. 2008;190(1):17-21.
33. Felson DT, McLaughlin S, Goggins J, et al. Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis. *Ann Intern Med*. 2003;139(5 Pt 1):330-336.
34. Felson DT, Chaisson CE, Hill CL, et al. The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. *Ann Intern Med*. 2001;134(7):541-549.
35. Grynopas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP. Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int*. 1991;49(1):20-26.
36. Hasegawa A, Otsuki S, Pauli C, et al. Anterior cruciate ligament changes in the human knee joint in aging and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(3):696-704.
37. Ding C, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, et al. Knee meniscal extrusion in a largely non-osteoarthritic cohort: association with greater loss of cartilage volume. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(2):R21.
38. Adams JG, McAlindon T, Dimasi M, Carey J, Eustace S. Contribution of meniscal extrusion and cartilage loss to joint space narrowing in osteoarthritis. *Clin Radiol*. 1999;54(8):502-506.
39. Berthiaume MJ, Raynauld JP, Martel-Pelletier J, et al. Meniscal tear and extrusion are strongly associated with progression of symptomatic knee osteoarthritis as assessed by quantitative magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(4):556-563.
40. Morgado I, Pérez A, Moguel M, Pérez-Bustamante F, Torres L. Guía de manejo clínico de la artrosis de cadera y rodilla. *Rev Soc Esp Dolor*. 2005;12(5):289-302.
41. Kobayashi T, Takagishi K, Shitara H, et al. Prevalence of and risk factors for shoulder osteoarthritis in Japanese middle-aged and elderly populations. *J Shoulder Elbow Surg*. 2014;23(5):613-619.
42. Stanley D. Prevalence and etiology of symptomatic elbow osteoarthritis. *J Shoulder Elbow Surg*. 1994;3(6):386-389.
43. Research AC. OSTEOARTHRITIS IN GENERAL PRACTICE. 2013; <http://www.arthritisresearchuk.org/>.

44. Saltzman CL, Salamon ML, Blanchard GM, et al. Epidemiology of ankle arthritis: report of a consecutive series of 639 patients from a tertiary orthopaedic center. *Iowa Orthop J*. 2005;25:44-46.
45. Altman RD, Gold GE. Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15 Suppl A:A1-56.
46. Wesseling J, Bierma-Zeinstra SM, Kloppenburg M, Meijer R, Bijlsma JW. Worsening of pain and function over 5 years in individuals with 'early' OA is related to structural damage: data from the Osteoarthritis Initiative and CHECK (Cohort Hip & Cohort Knee) study. *Ann Rheum Dis*. 2013.
47. Hannan MT, Felson DT, Pincus T. Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol*. 2000;27(6):1513-1517.
48. Guermazi A, Hayashi D, Roemer FW, Felson DT. Osteoarthritis: a review of strengths and weaknesses of different imaging options. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013;39(3):567-591.
49. Guermazi A, Hunter DJ, Roemer FW. Plain radiography and magnetic resonance imaging diagnostics in osteoarthritis: validated staging and scoring. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91 Suppl 1:54-62.
50. Felson DT, Niu J, Guermazi A, Sack B, Aliabadi P. Defining radiographic incidence and progression of knee osteoarthritis: suggested modifications of the Kellgren and Lawrence scale. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(11):1884-1886.
51. Grainger RG, Allison DJ. *Grainger & Allison's diagnostic radiology: a textbook of medical imaging*. Vol 1: Churchill Livingstone; 1997.
52. Schneider E, Nassaiver M. The Osteoarthritis Initiative (OAI) magnetic resonance imaging quality assurance update. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(1):110-116.
53. Fife RS, Brandt KD, Braunstein EM, et al. Relationship between arthroscopic evidence of cartilage damage and radiographic evidence of joint space narrowing in early osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism*. 1991;34(4):377-382.
54. Raynauld P, Martel - Pelletier J, Berthiaume MJ, et al. Quantitative magnetic resonance imaging evaluation of knee osteoarthritis progression over two years and correlation with clinical symptoms and radiologic changes. *Arthritis & Rheumatism*. 2004;50(2):476-487.
55. Amin S, LaValley MP, Guermazi A, et al. The relationship between cartilage loss on magnetic resonance imaging and radiographic progression in men and women with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(10):3152-3159.
56. Hunter DJ, Zhang YQ, Tu X, et al. Change in joint space width: hyaline articular cartilage loss or alteration in meniscus? *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2488-2495.
57. Joseph GB, Baum T, Carballido-Gamio J, et al. Texture analysis of cartilage T2 maps: individuals with risk factors for OA have higher and more heterogeneous knee cartilage MR T2 compared to normal controls--data from the osteoarthritis initiative. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):R153.
58. Kinds MB, Vincken KL, Hoppinga TN, et al. Influence of variation in semiflexed knee positioning during image acquisition on separate quantitative radiographic parameters of osteoarthritis, measured by Knee Images Digital Analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(9):997-1003.
59. Reijman M, Hazes JM, Pols HA, Bernsen RM, Koes BW, Bierma-Zeinstra SM. Role of radiography in predicting progression of osteoarthritis of the hip: prospective cohort study. *BMJ*. 2005;330(7501):1183.
60. Belo JN, Berger MY, Reijman M, Koes BW, Bierma-Zeinstra SM. Prognostic factors of progression of osteoarthritis of the knee: a systematic review of observational studies. *Arthritis Rheum*. 2007;57(1):13-26.



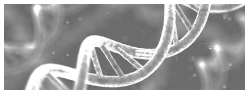
61. Chapple CM, Nicholson H, Baxter GD, Abbott JH. Patient characteristics that predict progression of knee osteoarthritis: a systematic review of prognostic studies. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(8):1115-1125.
62. Tanamas S, Hanna FS, Cicuttini FM, Wluka AE, Berry P, Urquhart DM. Does knee malalignment increase the risk of development and progression of knee osteoarthritis? A systematic review. *Arthritis Rheum*. 2009;61(4):459-467.
63. Brouwer GM, van Tol AW, Bergink AP, et al. Association between valgus and varus alignment and the development and progression of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 2007;56(4):1204-1211.
64. Ding C, Zhang Y, Hunter D. Use of imaging techniques to predict progression in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(1):127-135.
65. Palmer AJ, Brown CP, McNally EG, et al. Non-invasive imaging of cartilage in early osteoarthritis. *Bone Joint J*. 2013;95-B(6):738-746.
66. Eckstein F, Kwok CK, Boudreau RM, et al. Quantitative MRI measures of cartilage predict knee replacement: a case-control study from the Osteoarthritis Initiative. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(5):707-714.
67. Wirth W, Buck R, Nevitt M, et al. MRI-based extended ordered values more efficiently differentiate cartilage loss in knees with and without joint space narrowing than region-specific approaches using MRI or radiography--data from the OA initiative. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(6):689-699.
68. Wirth W, Larroque S, Davies RY, et al. Comparison of 1-year vs 2-year change in regional cartilage thickness in osteoarthritis results from 346 participants from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(1):74-83.
69. Eckstein F, Burstein D, Link TM. Quantitative MRI of cartilage and bone: degenerative changes in osteoarthritis. *NMR Biomed*. 2006;19(7):822-854.
70. Peterfy C, Kothari M. Imaging osteoarthritis: magnetic resonance imaging versus x-ray. *Curr Rheumatol Rep*. 2006;8(1):16-21.
71. Li X, Kuo D, Theologis A, et al. Cartilage in anterior cruciate ligament-reconstructed knees: MR imaging T1{rho} and T2--initial experience with 1-year follow-up. *Radiology*. 2011;258(2):505-514.
72. Urish KL, Keffalas MG, Durkin JR, Miller DJ, Chu CR, Mosher TJ. T2 texture index of cartilage can predict early symptomatic OA progression: data from the osteoarthritis initiative. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013.
73. Hunter DJ. Advanced imaging in osteoarthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2008;66(3):251-260.
74. Peterfy CG, Guermazi A, Zaim S, et al. Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(3):177-190.
75. Roemer FW, Eckstein F, Guermazi A. Magnetic resonance imaging-based semiquantitative and quantitative assessment in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2009;35(3):521-555.
76. Hunter DJ, Le Graverand MP, Eckstein F. Radiologic markers of osteoarthritis progression. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21(2):110-117.
77. Eckstein F, Kwok CK, Link TM, investigators O. Imaging research results from the osteoarthritis initiative (OAI): a review and lessons learned 10 years after start of enrolment. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(7):1289-1300.
78. Hunter DJ, Zhang YQ, Niu JB, et al. The association of meniscal pathologic changes with cartilage loss in symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(3):795-801.
79. Hunter DJ, Zhang Y, Niu J, et al. Increase in bone marrow lesions associated with cartilage loss: a longitudinal magnetic resonance imaging study of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(5):1529-1535.

80. Tanamas SK, Wluka AE, Pelletier JP, et al. Bone marrow lesions in people with knee osteoarthritis predict progression of disease and joint replacement: a longitudinal study. *Rheumatology (Oxford)*. 2010;49(12):2413-2419.
81. Kothari A, Guermazi A, Chmiel JS, et al. Within-subregion relationship between bone marrow lesions and subsequent cartilage loss in knee osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(2):198-203.
82. Wluka AE, Hanna F, Davies-Tuck M, et al. Bone marrow lesions predict increase in knee cartilage defects and loss of cartilage volume in middle-aged women without knee pain over 2 years. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(6):850-855.
83. Keen HI, Wakefield RJ, Conaghan PG. A systematic review of ultrasonography in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(5):611-619.
84. Keen HI, Conaghan PG. Usefulness of ultrasound in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2009;35(3):503-519.
85. Iagnocco A, Conaghan PG, Aegerter P, et al. The reliability of musculoskeletal ultrasound in the detection of cartilage abnormalities at the metacarpophalangeal joints. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(10):1142-1146.
86. Braun HJ, Gold GE. Diagnosis of osteoarthritis: imaging. *Bone*. 2012;51(2):278-288.
87. Omoumi P, Mercier GA, Lecouvet F, Simoni P, Vande Berg BC. CT arthrography, MR arthrography, PET, and scintigraphy in osteoarthritis. *Radiol Clin North Am*. 2009;47(4):595-615.
88. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum*. 1995;38(8):1134-1141.
89. Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, Cooper C. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *Br Med Bull*. 2013;105:185-199.
90. Carmona L, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, Group ES. The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(11):1040-1045.
91. Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, et al. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;59(9):1207-1213.
92. Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(11):1270-1285.
93. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*. 1987;30(8):914-918.
94. Peña Ayala AH, Fernández-López JC. [Prevalence and risk factors in osteoarthritis]. *Reumatol Clin*. 2007;3 Suppl 3:S6-S12.
95. Cooper C, Javaid MK, Arden N. Epidemiology of osteoarthritis. *Atlas of Osteoarthritis*: Springer; 2014:21-36.
96. Cross M, Smith E, Hoy D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(7):1323-1330.
97. Nho SJ, Kymes SM, Callaghan JJ, Felson DT. The burden of hip osteoarthritis in the United States: epidemiologic and economic considerations. *J Am Acad Orthop Surg*. 2013;21 Suppl 1:S1-6.
98. Smith E, Hoy DG, Cross M, et al. The global burden of other musculoskeletal disorders: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(8):1462-1469.
99. Bitton R. The economic burden of osteoarthritis. *Am J Manag Care*. 2009;15(8 Suppl):S230-235.



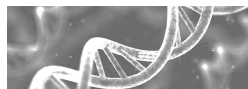
100. Rasker JJ. Rheumatology in general practice. *Br J Rheumatol*. 1995;34(6):494-497.
101. Hippisley-Cox J, Fenty J, Heaps M. Trends in Consultation Rates in General Practice 1995 to 2006: Analysis of the QRESEARCH database. *London: QResearch and The Information Centre for Health and Social Care*. 2007.
102. Murphy L, Helmick CG. The impact of osteoarthritis in the United States: a population-health perspective. *Am J Nurs*. 2012;112(3 Suppl 1):S13-19.
103. Murphy L, Helmick CG. The impact of osteoarthritis in the United States: a population-health perspective: A population-based review of the fourth most common cause of hospitalization in U.S. adults. *Orthop Nurs*. 2012;31(2):85-91.
104. Murray CJ, Richards MA, Newton JN, et al. UK health performance: findings of the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2013;381(9871):997-1020.
105. Abásolo L, Carmona L, Lajas C, et al. Prognostic factors in short-term disability due to musculoskeletal disorders. *Arthritis Rheum*. 2008;59(4):489-496.
106. Batlle-Gualda E, Carmona L, Gavrilu D, et al. [ArtRoCad: health resources utilization and socioeconomic impact of knee and hip osteoarthritis. I. Methods and population characteristics]. *Reumatol Clin*. 2006;2(5):224-234.
107. Nüesch E, Dieppe P, Reichenbach S, Williams S, Iff S, Jüni P. All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study. *BMJ*. 2011;342:d1165.
108. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, et al. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*. 1995;38(10):1500-1505.
109. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(1):16-21.
110. Forsyth CB, Cole A, Murphy G, Bienias JL, Im HJ, Loeser RF. Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60(9):1118-1124.
111. Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, et al. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(8):2376-2385.
112. Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(5):838-851.
113. Lotz M, Loeser RF. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone*. 2012;51(2):241-248.
114. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(9):769-781.
115. Maleki-Fischbach M, Jordan JM. New developments in osteoarthritis. Sex differences in magnetic resonance imaging-based biomarkers and in those of joint metabolism. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):212.
116. Riancho JA, García-Ibarbia C, Gravani A, et al. Common variations in estrogen-related genes are associated with severe large-joint osteoarthritis: a multicenter genetic and functional study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(7):927-933.
117. Hanna FS, Wluka AE, Bell RJ, Davis SR, Cicuttini FM. Osteoarthritis and the postmenopausal woman: Epidemiological, magnetic resonance imaging, and radiological findings. *Semin Arthritis Rheum*. 2004;34(3):631-636.

118. Nevitt MC, Felson DT, Williams EN, Grady D. The effect of estrogen plus progestin on knee symptoms and related disability in postmenopausal women: The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2001;44(4):811-818.
119. Cirillo DJ, Wallace RB, Wu L, Yood RA. Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the Women's Health Initiative. *Arthritis Rheum.* 2006;54(10):3194-3204.
120. Wluka AE, Davis SR, Bailey M, Stuckey SL, Cicuttini FM. Users of oestrogen replacement therapy have more knee cartilage than non-users. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(4):332-336.
121. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med.* 2010;26(3):355-369.
122. Nelson AE, Golightly YM, Renner JB, et al. Brief report: differences in multijoint symptomatic osteoarthritis phenotypes by race and sex: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum.* 2013;65(2):373-377.
123. Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, et al. Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol.* 2007;34(1):172-180.
124. Nevitt MC, Xu L, Zhang Y, et al. Very low prevalence of hip osteoarthritis among Chinese elderly in Beijing, China, compared with whites in the United States: the Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* 2002;46(7):1773-1779.
125. Zhang Y, Xu L, Nevitt MC, et al. Lower prevalence of hand osteoarthritis among Chinese subjects in Beijing compared with white subjects in the United States: the Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 2003;48(4):1034-1040.
126. Zhang Y, Xu L, Nevitt MC, et al. Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 2001;44(9):2065-2071.
127. Xu L, Nevitt MC, Zhang Y, Yu W, Alibadi P, Felson DT. [High prevalence of knee, but not hip or hand osteoarthritis in Beijing elders: comparison with data of Caucasian in United States]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2003;83(14):1206-1209.
128. Kopec JA, Sayre EC, Schwartz TA, et al. Occurrence of radiographic osteoarthritis of the knee and hip among African Americans and whites: a population-based prospective cohort study. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013;65(6):928-935.
129. Mazzuca SA, Brandt KD, Katz BP, Ding Y, Lane KA, Buckwalter KA. Risk factors for early radiographic changes of tibiofemoral osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(3):394-399.
130. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ.* 1996;312(7036):940-943.
131. Palotie A, Väisänen P, Ott J, et al. Predisposition to familial osteoarthrosis linked to type II collagen gene. *Lancet.* 1989;1(8644):924-927.
132. Felson DT, Couropmitree NN, Chaisson CE, et al. Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum.* 1998;41(6):1064-1071.
133. Edwards CJ, Francis-West PH. Bone morphogenetic proteins in the development and healing of synovial joints. *Semin Arthritis Rheum.* 2001;31(1):33-42.
134. Mikic B. Multiple effects of GDF-5 deficiency on skeletal tissues: implications for therapeutic bioengineering. *Ann Biomed Eng.* 2004;32(3):466-476.
135. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, et al. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet.* 2007;39(4):529-533.



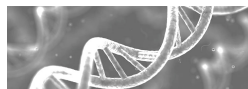
136. Southam L, Rodriguez-Lopez J, Wilkins JM, et al. An SNP in the 5'-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in allelic expression in articular cartilage. *Hum Mol Genet.* 2007;16(18):2226-2232.
137. Chapman K, Takahashi A, Meulenbelt I, et al. A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis susceptibility. *Hum Mol Genet.* 2008;17(10):1497-1504.
138. Dodd AW, Syddall CM, Loughlin J. A rare variant in the osteoarthritis-associated locus GDF5 is functional and reveals a site that can be manipulated to modulate GDF5 expression. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(5):517-521.
139. Minafra L, Bravatà V, Saporito M, et al. Genetic, clinical and radiographic signs in knee osteoarthritis susceptibility. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(2):R91.
140. Enochson L, Stenberg J, Brittberg M, Lindahl A. GDF5 reduces MMP13 expression in human chondrocytes via DKK1 mediated canonical Wnt signaling inhibition. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(4):566-577.
141. Lefebvre V, de Crombrughe B. Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 1998;16(9):529-540.
142. Kan A, Ikeda T, Fukai A, et al. SOX11 contributes to the regulation of GDF5 in joint maintenance. *BMC Dev Biol.* 2013;13:4.
143. Castaño Betancourt MC, Cailotto F, Kerkhof HJ, et al. Genome-wide association and functional studies identify the DOT1L gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(21):8218-8223.
144. Reynard LN, Loughlin J. The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility. *Expert Rev Mol Med.* 2013;15:e2.
145. Valdes AM, Spector TD, Tamm A, et al. Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2347-2352.
146. Bijsterbosch J, Kloppenburg M, Reijnen M, et al. Association study of candidate genes for the progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(4):565-569.
147. Mototani H, Mabuchi A, Saito S, et al. A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet.* 2005;14(8):1009-1017.
148. Meulenbelt I, Min JL, Bos S, et al. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* 2008;17(12):1867-1875.
149. Meulenbelt I, Bos SD, Chapman K, et al. Meta-analyses of genes modulating intracellular T3 bio-availability reveal a possible role for the DIO3 gene in osteoarthritis susceptibility. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):164-167.
150. Kostopoulou F, Gkretsi V, Malizos KN, et al. Central role of SREBP-2 in the pathogenesis of osteoarthritis. *PLoS One.* 2012;7(5):e35753.
151. Evangelou E, Valdes AM, Kerkhof HJ, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(2):349-355.
152. Valdes AM, Evangelou E, Kerkhof HJ, et al. The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(5):873-875.
153. Day-Williams AG, Southam L, Panoutsopoulou K, et al. A variant in MCF2L is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet.* 2011;89(3):446-450.
154. Zeggini E, Panoutsopoulou K, Southam L, et al. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet.* 2012;380(9844):815-823.

155. Rodriguez-Fontenla C, Gonzalez A. Genetics of osteoarthritis. *Reumatol Clin*. 2015;11(1):33-40.
156. Valdes AM, Spector TD. The contribution of genes to osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(3):581-603.
157. Claassen H, Schünke M, Kurz B. Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage. *Cell Tissue Res*. 2005;319(3):439-445.
158. Spector TD, Nandra D, Hart DJ, Doyle DV. Is hormone replacement therapy protective for hand and knee osteoarthritis in women?: The Chingford Study. *Ann Rheum Dis*. 1997;56(7):432-434.
159. de Klerk BM, Schiphof D, Groeneveld FP, et al. Limited evidence for a protective effect of unopposed oestrogen therapy for osteoarthritis of the hip: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(2):104-112.
160. Zhang Y, McAlindon TE, Hannan MT, et al. Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum*. 1998;41(10):1867-1873.
161. Lieveense AM, Bierma-Zeinstra SM, Verhagen AP, van Baar ME, Verhaar JA, Koes BW. Influence of obesity on the development of osteoarthritis of the hip: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(10):1155-1162.
162. Bierma-Zeinstra SM, Koes BW. Risk factors and prognostic factors of hip and knee osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007;3(2):78-85.
163. Yusuf E, Nelissen RG, Ioan-Facsinay A, et al. Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(4):761-765.
164. Issa RI, Griffin TM. Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*. 2012;2(2012).
165. Berenbaum F, Eymard F, Houard X. Osteoarthritis, inflammation and obesity. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(1):114-118.
166. Lieveense A, Bierma-Zeinstra S, Verhagen A, Verhaar J, Koes B. Influence of work on the development of osteoarthritis of the hip: a systematic review. *J Rheumatol*. 2001;28(11):2520-2528.
167. Jensen LK. Hip osteoarthritis: influence of work with heavy lifting, climbing stairs or ladders, or combining kneeling/squatting with heavy lifting. *Occup Environ Med*. 2008;65(1):6-19.
168. Palmer KT. Occupational activities and osteoarthritis of the knee. *Br Med Bull*. 2012;102:147-170.
169. Felson DT, Hannan MT, Naimark A, et al. Occupational physical demands, knee bending, and knee osteoarthritis: results from the Framingham Study. *J Rheumatol*. 1991;18(10):1587-1592.
170. Jensen LK. Knee osteoarthritis: influence of work involving heavy lifting, kneeling, climbing stairs or ladders, or kneeling/squatting combined with heavy lifting. *Occup Environ Med*. 2008;65(2):72-89.
171. Coggon D, Croft P, Kellingray S, Barrett D, McLaren M, Cooper C. Occupational physical activities and osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 2000;43(7):1443-1449.
172. Oldfors A, Tulinius M. Mitochondrial encephalomyopathies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(3):217-227.
173. Scheibye-Knudsen M, Fang EF, Croteau DL, Bohr VA. Contribution of defective mitophagy to the neurodegeneration in DNA repair-deficient disorders. *Autophagy*. 2014;10(8):1468-1469.
174. Pon LA, Schon EA. *Mitochondria*. Vol 80: Academic Press; 2011.



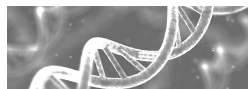
175. Ankel-Simons F, Cummins JM. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):13859-13863.
176. Alberts B. Molecular Biology of the Cell in Cell 4th. Figure; 2002.
177. Bölter B, Soll J. Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors or regulated gates? *EMBO J*. 2001;20(5):935-940.
178. Martin JA, Martini A, Molinari A, et al. Mitochondrial electron transport and glycolysis are coupled in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(4):323-329.
179. Lee RB, Urban JP. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J*. 1997;321 (Pt 1):95-102.
180. MITCHELL P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961;191:144-148.
181. du Plessis SS, Agarwal A, Mohanty G, van der Linde M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian J Androl*. 2014.
182. Koopman WJ, Willems PH, Smeitink JA. Monogenic mitochondrial disorders. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1132-1141.
183. Andreu AL, Gonzalo-Sanz R. [Mitochondrial disorders: a classification for the 21st century]. *Neurologia*. 2004;19(1):15-22.
184. Wallace DC, Fan W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*. 2010;10(1):12-31.
185. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*. 2003;348(26):2656-2668.
186. Reed KN, Wilson G, Pearsall A, Grishko VI. The role of mitochondrial reactive oxygen species in cartilage matrix destruction. *Mol Cell Biochem*. 2014.
187. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(2):200-214.
188. Zapico SC, Ubelaker DH. mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. *Aging Dis*. 2013;4(6):364-380.
189. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298-300.
190. Wallace DC. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp*. 2001;235:247-263; discussion 263-246.
191. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 2005;39:359-407.
192. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-465.
193. Coskun PE, Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2174-2176.
194. Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(23):9350-9354.
195. Lamson DW, Plaza SM. Mitochondrial factors in the pathogenesis of diabetes: a hypothesis for treatment. *Altern Med Rev*. 2002;7(2):94-111.
196. Malyarchuk BA, Rogozin IB, Berikov VB, Derenko MV. Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region. *Hum Genet*. 2002;111(1):46-53.
197. Brown WM, George M, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(4):1967-1971.

198. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988;331(6158):717-719.
199. Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988;242(4884):1427-1430.
200. LUFT R, IKKOS D, PALMIERI G, ERNSTER L, AFZELIUS B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest*. 1962;41:1776-1804.
201. DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Servidei S, DeVivo DC, Schon EA. Mitochondrial myopathies. *J Inherit Metab Dis*. 1987;10 Suppl 1:113-128.
202. Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol*. 2012;226(2):274-286.
203. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005;6(5):389-402.
204. Rötig A, Cormier V, Blanche S, et al. Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest*. 1990;86(5):1601-1608.
205. Liang C, Ahmad K, Sue CM. The broadening spectrum of mitochondrial disease: shifts in the diagnostic paradigm. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(4):1360-1367.
206. Schmiedel J, Jackson S, Schäfer J, Reichmann H. Mitochondrial cytopathies. *J Neurol*. 2003;250(3):267-277.
207. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(12):878-890.
208. Khrapko K, Turnbull D. Mitochondrial DNA mutations in aging. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;127:29-62.
209. Bratic A, Larsson NG. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest*. 2013;123(3):951-957.
210. Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol*. 2008;63(1):35-39.
211. Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet*. 1992;51(6):1187-1200.
212. .
213. Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J*. 2012;31(14):3038-3062.
214. Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(3):207-219.
215. Bates MG, Bourke JP, Giordano C, d'Amati G, Turnbull DM, Taylor RW. Cardiac involvement in mitochondrial DNA disease: clinical spectrum, diagnosis, and management. *Eur Heart J*. 2012;33(24):3023-3033.
216. Vyd't TC, de Co'o RF, Soliman OI, et al. Cardiac involvement in adults with m.3243A>G MELAS gene mutation. *Am J Cardiol*. 2007;99(2):264-269.
217. van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, et al. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet*. 1992;1(5):368-371.
218. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*. 1990;348(6302):651-653.



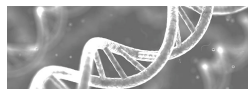
219. Taniike M, Fukushima H, Yanagihara I, et al. Mitochondrial tRNA(Ile) mutation in fatal cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;186(1):47-53.
220. Ware SM, El-Hassan N, Kahler SG, et al. Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes. *J Med Genet.* 2009;46(5):308-314.
221. Wen S, Zhu D, Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. *Future Med Chem.* 2013;5(1):53-67.
222. MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. 2013.
223. Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D514-517.
224. McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *Am J Hum Genet.* 2007;80(4):588-604.
225. Rubino F, Piredda R, Calabrese FM, et al. HmtDB, a genomic resource for mitochondrion-based human variability studies. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D1150-1159.
226. Shapiro IM, Leboy PS, Tokuoka T, et al. Ascorbic acid regulates multiple metabolic activities of cartilage cells. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(6 Suppl):1209S-1213S.
227. Fermor B, Christensen SE, Youn I, Cernanec JM, Davies CM, Weinberg JB. Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. *Eur Cell Mater.* 2007;13:56-65; discussion 65.
228. Ruiz-Romero C, Calamia V, Rocha B, Mateos J, Fernández-Puente P, Blanco FJ. Hypoxia conditions differentially modulate human normal and osteoarthritic chondrocyte proteomes. *J Proteome Res.* 2010;9(6):3035-3045.
229. Hüttemann M, Lee I, Grossman LI, Doan JW, Sanderson TH. Phosphorylation of mammalian cytochrome c and cytochrome c oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:237-264.
230. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003;11(10):747-755.
231. Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(1):107-113.
232. Surapaneni KM, Venkataramana G. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis. *Indian J Med Sci.* 2007;61(1):9-14.
233. Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, et al. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics.* Vol 8. United States 2009:172-189.
234. Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Pertega S, et al. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and serum levels of anti-oxidant enzymes in patients with osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011;12:264.
235. de Andrés MC, Maneiro E, Martín MA, Arenas J, Blanco FJ. Nitric oxide compounds have different effects profiles on human articular chondrocyte metabolism. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R115.
236. Maneiro E, Martín MA, de Andres MC, et al. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2003;48(3):700-708.
237. Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets.* 2007;8(2):333-345.

238. López-Armada MJ, Vaamonde-García C, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Blanco García FJ. [Evidence of inflammatory mechanisms in osteoarthritis]. *Reumatol Clin*. 2007;3 Suppl 3:S23-27.
239. Cillero-Pastor B, Caramés B, Lires-Deán M, Vaamonde-García C, Blanco FJ, López-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2008;58(8):2409-2419.
240. Wu L, Liu H, Li L, Cheng Q, Li H, Huang H. Mitochondrial pathology in osteoarthritic chondrocytes. *Curr Drug Targets*. 2014;15(7):710-719.
241. Huser CA, Peacock M, Davies ME. Inhibition of caspase-9 reduces chondrocyte apoptosis and proteoglycan loss following mechanical trauma. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(10):1002-1010.
242. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW, Lotz MK. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9(8):712-719.
243. Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(19):8739-8746.
244. Pakendorf B, Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:165-183.
245. Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, et al. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):171-176.
246. Wallace DC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2003;68:479-486.
247. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 1987;325(6099):31-36.
248. Ienco EC, Simoncini C, Orsucci D, et al. May "mitochondrial eve" and mitochondrial haplogroups play a role in neurodegeneration and Alzheimer's disease? *Int J Alzheimers Dis*. 2011;2011:709061.
249. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science*. 2004;303(5655):223-226.
250. Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylhä M, Majamaa K. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet*. 2003;112(1):29-33.
251. Ross OA, McCormack R, Curran MD, et al. Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population. *Exp Gerontol*. 2001;36(7):1161-1178.
252. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, et al. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J*. 1999;13(12):1532-1536.
253. Domínguez-Garrido E, Martínez-Redondo D, Martín-Ruiz C, et al. Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations. *Biogerontology*. 2009;10(4):435-442.
254. Latsoudis H, Spanaki C, Chlouverakis G, Plaitakis A. Mitochondrial DNA polymorphisms and haplogroups in Parkinson's disease and control individuals with a similar genetic background. *J Hum Genet*. 2008;53(4):349-356.
255. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, et al. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet*. 2010;19(17):3343-3353.
256. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, Martínez-Romero I, et al. Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(8):1216-1222.



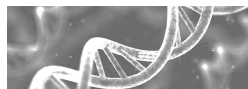
257. van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, et al. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2003;72(4):804-811.
258. Ghezzi D, Marelli C, Achilli A, et al. Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(6):748-752.
259. Pyle A, Foltynie T, Tiangyou W, et al. Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Ann Neurol.* 2005;57(4):564-567.
260. Gaweda-Walerych K, Zekanowski C. The impact of mitochondrial DNA and nuclear genes related to mitochondrial functioning on the risk of Parkinson's disease. *Curr Genomics.* 2013;14(8):543-559.
261. Santoro A, Balbi V, Balducci E, et al. Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2010;5(8):e12037.
262. Coskun P, Wyrembak J, Schriener SE, et al. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(5):553-564.
263. Chagnon P, Gee M, Filion M, Robitaille Y, Belouchi M, Gauvreau D. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population. *Am J Med Genet.* 1999;85(1):20-30.
264. van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, et al. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett.* 2004;365(1):28-32.
265. Baudouin SV, Saunders D, Tiangyou W, et al. Mitochondrial DNA and survival after sepsis: a prospective study. *Lancet.* 2005;366(9503):2118-2121.
266. Lorente L, Iceta R, Martín MM, et al. Severe septic patients with mitochondrial DNA haplogroup JT show higher survival rates: a prospective, multicenter, observational study. *PLoS One.* 2013;8(9):e73320.
267. O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, et al. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N Engl J Med.* 1996;334(7):426-431.
268. Guzmán-Fulgencio M, Berenguer J, Micheloud D, et al. European mitochondrial haplogroups are associated with CD4+ T cell recovery in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(10):2349-2357.
269. Fang H, Shen L, Chen T, et al. Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:421.
270. Cano D, Gomez CF, Ospina N, et al. Mitochondrial DNA haplogroups and susceptibility to prostate cancer in a colombian population. *ISRN Oncol.* 2014;2014:530675.
271. Earp MA, Brooks-Wilson A, Cook L, Le N. Inherited common variants in mitochondrial DNA and invasive serous epithelial ovarian cancer risk. *BMC Res Notes.* 2013;6:425.
272. Álvarez-Cubero MJ, Saiz Guinaldo M, Martínez-González LJ, Álvarez Merino JC, Cózar Olmo JM, Acosta JA. Mitochondrial haplogroups and polymorphisms reveal no association with sporadic prostate cancer in a southern European population. *PLoS One.* 2012;7(7):e41201.
273. Fachal L, Gómez-Caamaño A, Alvarez Iglesias V, et al. No association between typical European mitochondrial variation and prostate cancer risk in a Spanish cohort. *J Hum Genet.* 2014;59(7):411-414.
274. Houshmand M, Banoei MM, Tabarsi P, et al. Do mitochondrial DNA haplogroups play a role in susceptibility to tuberculosis? *Respirology.* 2007;12(6):823-827.

275. Malik D, Hsu T, Falatoonzadeh P, 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.
276. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, 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.
277. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, 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):208-219.
278. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(8):2387-2396.
279. Rego I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, et al. Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):210-213.
280. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Deberg M, et al. Mitochondrial DNA haplogroups modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(5):910-917.
281. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Deberg M, et al. Mitochondrial DNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(4):646-652.
282. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet*. 2000;67(3):682-696.
283. Martínez-Redondo D, Marcuello A, Casajús JA, et al. Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO2max consumer--is it a paradox? *Mitochondrion*. 2010;10(2):102-107.
284. Fernández-Moreno M, Tamayo M, Soto-Hermida A, et al. mtDNA haplogroup J modulates telomere length and nitric oxide production. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:283.
285. Fang H, Liu X, Shen L, et al. Role of mtDNA haplogroups in the prevalence of knee osteoarthritis in a southern Chinese population. *Int J Mol Sci*. 2014;15(2):2646-2659.
286. Hudson G, Panoutsopoulou K, Wilson I, et al. No evidence of an association between mitochondrial DNA variants and osteoarthritis in 7393 cases and 5122 controls. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(1):136-139.
287. Lane N. *Oxygen: the molecule that made the world*. Oxford University Press; 2002.
288. Lane N. *Power, sex, suicide: mitochondria and the meaning of life*. Oxford University Press; 2005.
289. Wallace DC. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:781-821.
290. Henze K, Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature*. 2003;426(6963):127-128.
291. Larsson NG. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:683-706.
292. Liu Z, Butow RA. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet*. 2006;40:159-185.
293. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr*. 1997;29(2):109-119.
294. Cannino G, Di Liegro CM, Rinaldi AM. Nuclear-mitochondrial interaction. *Mitochondrion*. 2007;7(6):359-366.



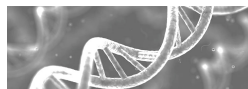
295. Jazwinski SM. The retrograde response: when mitochondrial quality control is not enough. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(2):400-409.
296. Jazwinski SM. Mitochondria to nucleus signaling and the role of ceramide in its integration into the suite of cell quality control processes during aging. *Ageing Res Rev*. 2014.
297. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1269-1278.
298. Goffart S, Wiesner RJ. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol*. 2003;88(1):33-40.
299. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*. 2008;88(2):611-638.
300. Calvo SE, Mootha VK. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:25-44.
301. Spinazzola A, Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic communication. *Biosci Rep*. 2007;27(1-3):39-51.
302. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014;505(7483):335-343.
303. Lane N. Mitochondrial disease: powerhouse of disease. *Nature*. 2006;440(7084):600-602.
304. Schapira AH. Mitochondrial diseases. *Lancet*. 2012;379(9828):1825-1834.
305. Zhu X, Peng X, Guan MX, Yan Q. Pathogenic mutations of nuclear genes associated with mitochondrial disorders. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009;41(3):179-187.
306. Jacobs HT, Turnbull DM. Nuclear genes and mitochondrial translation: a new class of genetic disease. *Trends Genet*. 2005;21(6):312-314.
307. Cottrell DA, Ince PG, Blakely EL, et al. Neuropathological and histochemical changes in a multiple mitochondrial DNA deletion disorder. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(7):621-627.
308. Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet*. 2001;28(3):211-212.
309. Kemp JP, Smith PM, Pyle A, et al. Nuclear factors involved in mitochondrial translation cause a subgroup of combined respiratory chain deficiency. *Brain*. 2011;134(Pt 1):183-195.
310. Tyynismaa H, Ylikallio E, Patel M, Molnar MJ, Haller RG, Suomalainen A. A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *Am J Hum Genet*. 2009;85(2):290-295.
311. Hudson G, Mowbray C, Elson JL, et al. Does mitochondrial DNA predispose to neuromyelitis optica (Devic's disease)? *Brain*. 2008;131(Pt 4):e93.
312. Zhu Z, Yao J, Johns T, et al. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet*. 1998;20(4):337-343.
313. Strauss KA, DuBiner L, Simon M, et al. Severity of cardiomyopathy associated with adenine nucleotide translocator-1 deficiency correlates with mtDNA haplogroup. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(9):3453-3458.
314. Cristina Kenney M, Chwa M, Atilano SR, et al. Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: insights into mitochondrial-nuclear interactions. *Hum Mol Genet*. 2014;23(13):3537-3551.
315. Tang ZH, Zeng F, Zhang XZ. Human genetics of diabetic nephropathy. *Ren Fail*. 2015:1-9.

316. Eckstein F, Wirth W, Nevitt MC. Recent advances in osteoarthritis imaging--the osteoarthritis initiative. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(10):622-630.
317. NIAMS. OAI. http://www.niams.nih.gov/News_and_Events/Press_Releases/2004/03_17.asp.
318. Castro MG, Terrados N, Reguero JR, Alvarez V, Coto E. Mitochondrial haplogroup T is negatively associated with the status of elite endurance athlete. *Mitochondrion*. 2007;7(5):354-357.
319. Pala M, Olivieri A, Achilli A, et al. Mitochondrial DNA signals of late glacial recolonization of Europe from near eastern refugia. *Am J Hum Genet*. 2012;90(5):915-924.
320. Richards MB, Macaulay VA, Bandelt HJ, Sykes BC. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann Hum Genet*. 1998;62(Pt 3):241-260.
321. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999;283(5407):1482-1488.
322. Nikoskelainen E, Wanne O, Dahl M. Pre-excitation syndrome and Leber's hereditary optic neuroretinopathy. *Lancet*. 1985;1(8430):696.
323. Thomas AW, Edwards A, Sherratt EJ, Majid A, Gagg J, Alcolado JC. Molecular scanning of candidate mitochondrial tRNA genes in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *J Med Genet*. 1996;33(3):253-255.
324. Obayashi T, Hattori K, Sugiyama S, et al. Point mutations in mitochondrial DNA in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J*. 1992;124(5):1263-1269.
325. Arnestad M, Opdal SH, Vege A, Rognum TO. A mitochondrial DNA polymorphism associated with cardiac arrhythmia investigated in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr*. 2007;96(2):206-210.
326. Matsuoka R, Furutani M, Hayashi J, et al. A mitochondrial DNA mutation cosegregates with the pathophysiological U wave. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257(1):228-233.
327. Marcuello A, Martínez-Redondo D, Dahmani Y, et al. Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion*. 2009;9(1):27-30.
328. Gaweda-Walerych K, Maruszak A, Safranow K, et al. Mitochondrial DNA haplogroups and subhaplogroups are associated with Parkinson's disease risk in a Polish PD cohort. *J Neural Transm*. 2008;115(11):1521-1526.
329. Alfonso-Sánchez MA, Cardoso S, Martínez-Bouzas C, et al. Mitochondrial DNA haplogroup diversity in Basques: a reassessment based on HVI and HVII polymorphisms. *Am J Hum Biol*. 2008;20(2):154-164.
330. Logan J. The subclades of mtDNA haplogroup J and proposed motifs for assigning control-region sequences into these clades. 2008.
331. Zhang W, McWilliams DF, Ingham SL, et al. Nottingham knee osteoarthritis risk prediction models. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(9):1599-1604.
332. Vilím V, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Kraus VB, Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(9):707-713.
333. Botha-Scheepers S, Riyazi N, Watt I, et al. Progression of hand osteoarthritis over 2 years: a clinical and radiological follow-up study. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(8):1260-1264.
334. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, et al. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*. 1996;144(4):1835-1850.
335. Larsen S, Díez-Sánchez C, Rabøl R, Ara I, Dela F, Helge JW. Increased intrinsic mitochondrial function in humans with mitochondrial haplogroup H. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1837(2):226-231.



336. Henrotin Y, Kurz B. Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality? *Curr Drug Targets*. 2007;8(2):347-357.
337. 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.
338. Zhai G, Hart DJ, Kato BS, MacGregor A, Spector TD. Genetic influence on the progression of radiographic knee osteoarthritis: a longitudinal twin study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(2):222-225.
339. Valdes AM, Spector TD. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):23-32.
340. Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(3):161-169.
341. Attur M, Wang HY, Kraus VB, et al. Radiographic severity of knee osteoarthritis is conditional on interleukin 1 receptor antagonist gene variations. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(5):856-861.
342. Kerkhof HJ, Doherty M, Arden NK, et al. Large-scale meta-analysis of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms on risk of radiographic hip and knee osteoarthritis and severity of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(3):265-271.
343. Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, et al. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(8):2497-2507.
344. Takahashi H, Nakajima M, Ozaki K, Tanaka T, Kamatani N, Ikegawa S. Prediction model for knee osteoarthritis based on genetic and clinical information. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):R187.
345. Valdes AM, Doherty M, Spector TD. The additive effect of individual genes in predicting risk of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(1):124-127.
346. Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Pértega-Díaz S, et al. Mitochondrial DNA haplogroups modulate the radiographic progression of Spanish patients with osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2014.
347. Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Oreiro N, Fernández-López C, Rego-Pérez I, Blanco FJ. mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *Mitochondrion*. 2014;15:18-23.
348. Herrnstadt C, Howell N. An evolutionary perspective on pathogenic mtDNA mutations: haplogroup associations of clinical disorders. *Mitochondrion*. 2004;4(5-6):791-798.
349. Dato S, Passarino G, Rose G, et al. Association of the mitochondrial DNA haplogroup J with longevity is population specific. *Eur J Hum Genet*. 2004;12(12):1080-1082.
350. Mazzuca SA, Brandt KD, Katz BP, Ding Y, Lane KA, Buckwalter KA. Risk factors for progression of tibiofemoral osteoarthritis: an analysis based on fluoroscopically standardised knee radiography. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(4):515-519.
351. Le Graverand MP, Vignon EP, Brandt KD, et al. Head-to-head comparison of the Lyon Schuss and fixed flexion radiographic techniques. Long-term reproducibility in normal knees and sensitivity to change in osteoarthritic knees. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(11):1562-1566.
352. Benichou OD, Hunter DJ, Nelson DR, et al. One-year change in radiographic joint space width in patients with unilateral joint space narrowing: data from the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(7):924-931.

353. Ledingham J, Regan M, Jones A, Doherty M. Radiographic patterns and associations of osteoarthritis of the knee in patients referred to hospital. *Ann Rheum Dis*. 1993;52(7):520-526.
354. Zhao D, Banks SA, D'Lima DD, Colwell CW, Fregly BJ. In vivo medial and lateral tibial loads during dynamic and high flexion activities. *J Orthop Res*. 2007;25(5):593-602.
355. Wirth W, Hellio Le Graverand MP, Wyman BT, et al. Regional analysis of femorotibial cartilage loss in a subsample from the Osteoarthritis Initiative progression subcohort. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(3):291-297.
356. Wirth W, Nevitt M, Hellio Le Graverand MP, et al. Sensitivity to change of cartilage morphometry using coronal FLASH, sagittal DESS, and coronal MPR DESS protocols--comparative data from the Osteoarthritis Initiative (OAI). *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(4):547-554.
357. Eckstein F, Nevitt M, Gimona A, et al. Rates of change and sensitivity to change in cartilage morphology in healthy knees and in knees with mild, moderate, and end-stage radiographic osteoarthritis: results from 831 participants from the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(3):311-319.
358. Wu X, Kondragunta V, Kornman KS, et al. IL-1 receptor antagonist gene as a predictive biomarker of progression of knee osteoarthritis in a population cohort. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(7):930-938.
359. Suantawee T, Tantavisut S, Adisakwattana S, et al. Oxidative stress, vitamin e, and antioxidant capacity in knee osteoarthritis. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(9):1855-1859.
360. Wallace DC. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2013;368(1622):20120267.
361. Nardelli C, Labruna G, Liguori R, et al. Haplogroup T is an obesity risk factor: mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *Biomed Res Int*. 2013;2013:631082.
362. Deberg M, Dubuc JE, Labasse A, et al. One-year follow-up of Coll2-1, Coll2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in osteoarthritis patients after hip or knee replacement. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(2):168-174.
363. Henrotin Y, Deby-Dupont G, Deby C, De Bruyn M, Lamy M, Franchimont P. Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes. *Br J Rheumatol*. 1993;32(7):562-567.
364. Karan A, Karan MA, Vural P, et al. Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2003;22(6):397-399.
365. Maneiro E, López-Armada MJ, de Andres MC, et al. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(3):388-395.
366. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest*. 1996;97(9):2011-2019.
367. Elliott AL, Kraus VB, Luta G, et al. Serum hyaluronan levels and radiographic knee and hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians in the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum*. 2005;52(1):105-111.
368. Mazières B, Garnero P, Guéguen A, et al. Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. The ECHODIAH Cohort. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(3):354-359.



369. Filková M, Senolt L, Braun M, et al. Serum hyaluronic acid as a potential marker with a predictive value for further radiographic progression of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(12):1615-1619.
370. Nishida Y, D'Souza AL, Thonar EJ, Knudson W. Stimulation of hyaluronan metabolism by interleukin-1alpha in human articular cartilage. *Arthritis Rheum*. 2000;43(6):1315-1326.
371. Aigner T, Stöss H, Weseloh G, Zeiler G, von der Mark K. Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1992;62(6):337-345.
372. Lohmander LS, Yoshihara Y, Roos H, Kobayashi T, Yamada H, Shinmei M. Procollagen II C-propeptide in joint fluid: changes in concentration with age, time after knee injury, and osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1996;23(10):1765-1769.
373. Nelson F, Dahlberg L, Lavery S, et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest*. 1998;102(12):2115-2125.
374. Reginato AM, Olsen BR. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res*. 2002;4(6):337-345.
375. Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1404-1407.
376. Valdes AM, Spector TD. The clinical relevance of genetic susceptibility to osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(1):3-14.
377. Terkeltaub R, Johnson K, Murphy A, Ghosh S. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion*. 2002;1(4):301-319.
378. Regan E, Flannelly J, Bowler R, et al. Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3479-3491.
379. 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.
380. Hagen CM, Aidt FH, Hedley PL, et al. Mitochondrial haplogroups modify the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy in a Danish population. *PLoS One*. 2013;8(8):e71904.
381. Bhopal RS, Rafnsson SB. Could mitochondrial efficiency explain the susceptibility to adiposity, metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases in South Asian populations? *Int J Epidemiol*. 2009;38(4):1072-1081.
382. Pinós T, Nogales-Gadea G, Ruiz JR, et al. Are mitochondrial haplogroups associated with extreme longevity? A study on a Spanish cohort. *Age (Dordr)*. 2012;34(1):227-233.
383. Hoaglund FT. Primary osteoarthritis of the hip: a genetic disease caused by European genetic variants. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(5):463-468.
384. Lu YW, Claypool SM. Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Front Genet*. 2015;6:3.
385. Di Donato S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis*. 2000;23(3):247-263.
386. Ugalde C, Morán M, Blázquez A, Arenas J, Martín MA. Mitochondrial disorders due to nuclear OXPHOS gene defects. *Adv Exp Med Biol*. 2009;652:85-116.
387. Rea IM, McNerlan SE, Archbold GP, et al. Mitochondrial J haplogroup is associated with lower blood pressure and anti-oxidant status: findings in octo/nonagenarians from the BELFAST Study. *Age (Dordr)*. 2013;35(4):1445-1456.
388. Fridlyand LE, Philipson LH. Cold climate genes and the prevalence of type 2 diabetes mellitus. *Med Hypotheses*. 2006;67(5):1034-1041.

389. Amo T, Brand MD. Were inefficient mitochondrial haplogroups selected during migrations of modern humans? A test using modular kinetic analysis of coupling in mitochondria from cybrid cell lines. *Biochem J.* 2007;404(2):345-351.
390. Sun C, Kong QP, Zhang YP. The role of climate in human mitochondrial DNA evolution: a reappraisal. *Genomics.* 2007;89(3):338-342.
391. Kivisild T, Shen P, Wall DP, et al. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics.* 2006;172(1):373-387.
392. Elson JL, Turnbull DM, Howell N. Comparative genomics and the evolution of human mitochondrial DNA: assessing the effects of selection. *Am J Hum Genet.* 2004;74(2):229-238.

VII. ANEXOS

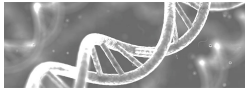
7.1 ANEXO 1

Material suplementario capítulo 1:
“mtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations”

Supplementary table 1. Frequency of mitochondrial DNA (mtDNA) SNPs in haplogroup J samples in Spanish and UK cohorts

mtDNA SNP*	Spain	UK	Gene region	Aminoacidic substitution
	(N = 6)	(N = 6)		
m.709g>a	1 (16.7)	0 (0)	12S rRNA	
m.1536a>g	1 (16.7)	0 (0)	12S rRNA	
m.2706a>g	6 (100)	5 (83.3)	16S rRNA	
m.2623a>g	1 (16.7)	0 (0)	16S rRNA	
m.3456t>c	0 (0)	1 (16.7)	ND1	synonymous
m.3394t>c	3 (50)	1 (16.7)	ND1	Tyrosine-Histidine
m.4232t>c	1 (16.7)	0 (0)	ND1	Isoleucine-Threonine
m.5198a>g	0 (0)	1 (16.7)	ND2	synonymous
m.7184a>g	3 (50)	0 (0)	COI	synonymous
m.7142t>c	1 (16.7)	0 (0)	COI	synonymous
m.9154g>a	1 (16.7)	1 (16.7)	ATPase 6	Glutamine-Lysine
m.7966c>t	0 (0)	1 (16.7)	COII	synonymous
m.9152t>c	2 (33.3)	0 (0)	ATPase 6	Isoleucine-Threonine
m.7678t>c	1 (16.7)	0 (0)	COII	synonymous
m.9180a>g	1 (16.7)	0 (0)	ATPase 6	synonymous
m.9755g>a	0 (0)	1 (16.7)	COIII	synonymous
m.9497t>c	0 (0)	1 (16.7)	COIII	synonymous
m.11719g>a	5 (83.3)	6 (100)	ND4	synonymous
m.10454t>c	0 (0)	1 (16.7)	Arginine tRNA	
m.10685g>a	0 (0)	1 (16.7)	ND4L	synonymous
m.13934c>t	1 (16.7)	2 (33.3)	ND5	Threonine-Methionine
m.13281t>c	0 (0)	1 (16.7)	ND5	synonymous
m.13933a>g	0 (0)	1 (16.7)	ND5	Threonine-Alanine
m.14198g>a	0 (0)	1 (16.7)	ND6	Proline-Leucine
m.14332a>g	0 (0)	1 (16.7)	ND6	synonymous
m.16122c>t	0 (0)	1 (16.7)	Non-coding	
m.185g>a	5 (83.3)	5 (83.3)	Non-coding	
m.228g>a	3 (50)	5 (83.3)	Non-coding	
m.263a>g	6 (100)	5 (83.3)	Non-coding	
m.16261c>a	0 (0)	1 (16.7)	Non-coding	
m.16519t>c	2 (33.3)	2 (33.3)	Non-coding	
m.146t>c	0 (0)	1 (16.7)	Non-coding	
m.188a>g	3 (50)	2 (33.3)	Non-coding	
m.222c>t	0 (0)	1 (16.7)	Non-coding	
m.16093t>c	0 (0)	2 (33.37)	Non-coding	
m.ins302c	4 (66.7)	1 (16.7)	Non-coding	
m.16357t>c	0 (0)	1 (16.7)	Non-coding	
m.16189t>c	0 (0)	1 (16.7)	Non-coding	
m.16311t>c	1 (16.7)	1 (16.7)	Non-coding	
m.482t>c	3 (50)	1 (16.7)	Non-coding	
m.533a>g	1 (16.7)	0 (0)	Non-coding	
m.241a>g	1 (16.7)	0 (0)	Non-coding	
m.16366c>t	1 (16.7)	0 (0)	Non-coding	

(*) Those SNPs that were represented in the whole 12 samples were excluded from this table. In bold appear the most differentially represented SNPs between Spain and UK. Values are number of samples with percentage in parentheses. rRNA: ribosomic ribonucleic acid; tRNA: transferent ribonucleic acid; ND1: NADH dehydrogenase subunit 1; ND2: NADH dehydrogenase subunit 2; ND4: NADH dehydrogenase subunit 4; ND4L: NADH dehydrogenase subunit 4L; ND5: NADH dehydrogenase subunit 5; ND6: NADH dehydrogenase subunit 6; COI: Cytochrome c oxidase subunit 1; COII: Cytochrome c oxidase subunit 2; COIII: Cytochrome c oxidase subunit 3; ATPase 6: Adenosin Triphosphate synthase subunit 6.



Supplementary table 1a for reviewer 2. Frequencies and odds ratios (ORs) of mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups in new knee OA patients and knee healthy controls from the Spanish cohort

Haplogroups	Control	OA	Total	OR	95% CI		nominal p-value
	(N = 159)	(N = 550)	(N = 709)		Lower CI	Upper CI	
H	74 (46.5)	250 (45.5)	324 (45.7)	0.957	0.672	1.364	0.809
J	21 (13.2)	44 (8.0)	65 (9.2)	0.571	0.329	0.993	0.045 ⁺
T	16 (10.1)	48 (8.7)	64 (9.0)	0.855	0.471	1.550	0.605
U ^{&}	32 (20.1)	106 (19.3)	138 (19.5)	0.893	0.533	1.497	0.668
Others	16 (10.1)	102 (18.5)	118 (16.6)	2.035	1.170	3.538	0.011 ⁺

Values are number of samples with percentage in parentheses

OR = Odd Ratio

CI = confidence interval

(+) indicates statistical significance ($p < 0.05$) before Bonferroni correction

(&) The haplogroup U data include the K subgroup

Supplementary table 1b for reviewer 2. Frequencies and odds ratios (ORs) of mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups in new hip OA patients and hip healthy controls from the Spanish cohort

Haplogroups	Control	OA	Total	OR	95% CI		nominal p-value
	(N = 397)	(N = 439)	(N = 836)		Lower CI	Upper CI	
H	167 (42.1)	209 (47.6)	376 (45.0)	1.251	0.952	1.645	0.108
J	47 (11.8)	35 (8.0)	82 (9.8)	0.645	0.407	1.022	0.061
T	36 (9.1)	34 (7.7)	70 (8.4)	0.842	0.516	1.374	0.490
U ^{&}	99 (24.9)	103 (23.5)	202 (24.2)	0.782	0.538	1.136	0.196
Others	48 (12.1)	58 (13.2)	106 (12.7)	1.107	0.737	1.662	0.627

Values are number of samples with percentage in parentheses

OR = Odd Ratio

CI = confidence interval

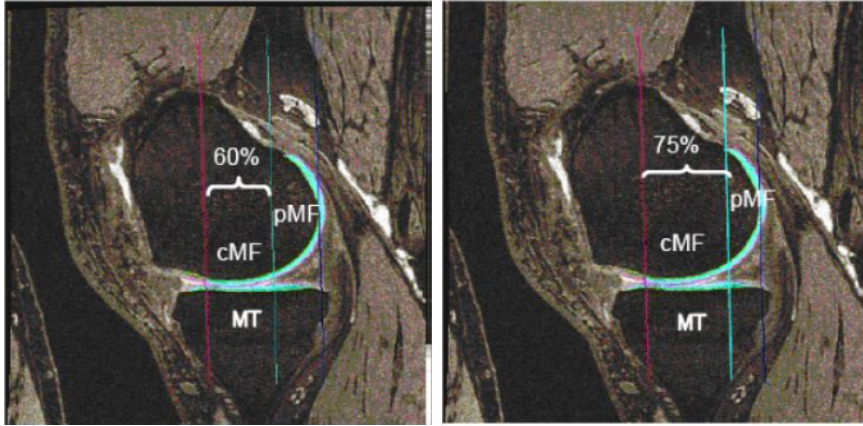
(&) The haplogroup U data include the K subgroup

7.2 ANEXO 2

Material suplementario capítulo 3:

“Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups influence the progression of osteoarthritis. Data from the Osteoarthritis Initiative (OAI)”

Figure S1



Sagittal RM images (DESSwe sequence) with the cartilage of MF being divided into cMF and pMF at 60% (left) and 75% (right) of the distance between the trochlear notch and the posterior end of the femoral condyle; MT: medial tibia; MF: medial femoral condyle; cMF: central (weight bearing) medial femoral condyle; pMF: posterior medial femoral condyle.

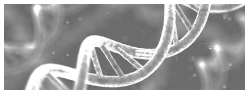
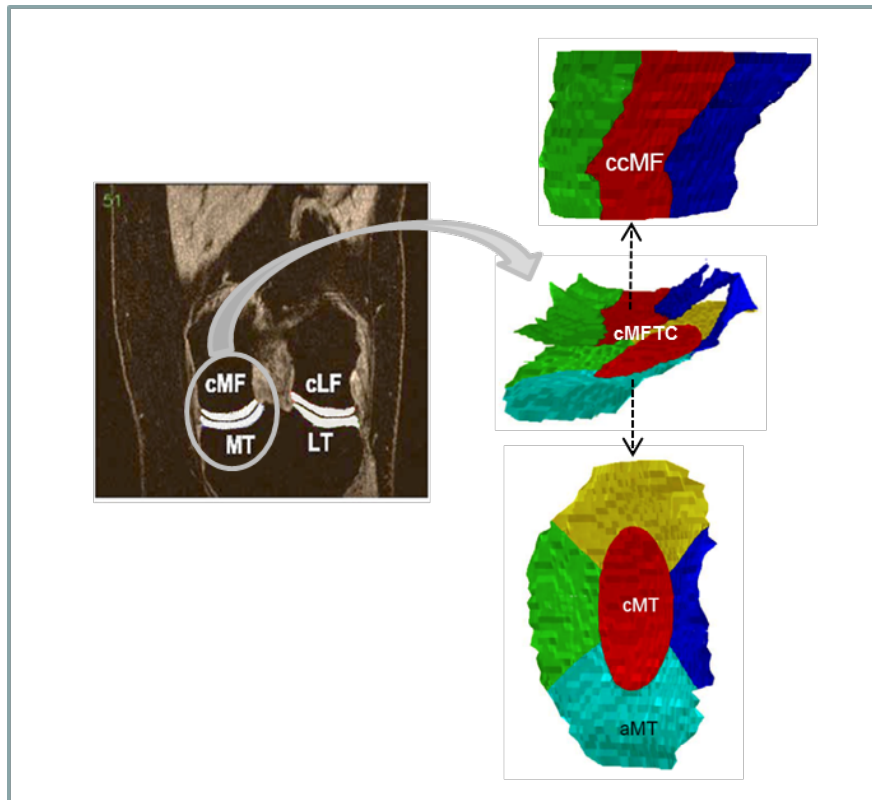


Figure S2



Representative subregions of the knee used to track changes in cartilage thickness and volume. cMF: central (weight-bearing) medial femoral condyle; MT: medial tibia; cLF: central (weight-bearing) lateral femoral condyle; LT: lateral tibia; ccMF: central subregion of central (weight-bearing) medial femur; cMFTC: central medial femoro-tibial compartment; cMT: central subregion of medial tibia; aMT: anterior subregion of medial tibia.

Table S1

Table S1. Longitudinal change between baseline (T_0) and 24 months (T_2) in quantitative parameters of cartilage integrity (volume and thickness) grouped by mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups

	H (n=152)		J (n=32)		T (n=38)		Uk (n=95)		Others (n=64)	
	Mean	SRM	Mean	SRM	Mean	SRM	Mean	SRM	Mean	SRM
Cartilage volume										
MFTC.VCtAB	-0.12±0.25	-0.50	-0.12±0.22	-0.54	-0.04±0.12	-0.33	-0.08±0.16	-0.51	-0.09±0.19	-0.48
cMF.VCtAB	-0.08±0.18	-0.46	-0.07±0.15	-0.44	-0.03±0.10	-0.27	-0.06±0.11	-0.51	-0.05±0.12	-0.44
MFTC.VC (x1000)	-0.11±0.25	-0.45	-0.11±0.21	-0.53	-0.02±0.12	-0.19	-0.08±0.15	-0.53	-0.08±0.18	-0.42
cMF.VC (x1000)	-0.07±0.15	-0.44	-0.05±0.13	-0.41	-0.01±0.08	-0.14	-0.04±0.09	-0.49	-0.04±0.10	-0.39
Cartilage thickness										
cMFTC.ThCtAB	-0.24±0.41	-0.57	-0.23±0.38	-0.60	-0.08±0.18	-0.42	-0.16±0.28	-0.55	-0.18±0.32	-0.57
MFTC.ThCtAB	-0.13±0.26	-0.50	-0.13±0.23	-0.56	-0.04±0.12	-0.32	-0.08±0.16	-0.50	-0.09±0.19	-0.47
aMT.ThCtAB	-0.02±0.10	-0.23	-0.05±0.07	-0.23	+0.02±0.08	+0.31	-0.01±0.09	-0.13	-0.02±0.11	-0.21
ccMF.ThCtAB	-0.13±0.29	-0.46	-0.10±0.21	-0.45	-0.03±0.14	-0.19	-0.09±0.18	-0.50	-0.10±0.20	-0.48

Data are mean±standard deviation, in millimetres (mm), except for MFTC.VC and cMF.VC that are shown in cubic millimetres (mm³); SRM: standardized response means (mean divided by SD); MFTC.VCtAB: normalized cartilage volume in medial tibia femoral compartment; cMF.VCtAB: normalized cartilage volume in central medial femoral; MFTC.VC: cartilage volume in medial tibia femoral compartment; cMF.VC: volume of cartilage in central medial femoral; cMFTC.ThCtAB: mean cartilage thickness in central medial tibia femoral compartment (weight-bearing); MFTC.ThCtAB: mean cartilage thickness in medial tibia femoral compartment; aMT.ThCtAB: mean cartilage thickness in medial tibia (anterior); ccMF.ThCtAB: mean cartilage thickness in central medial femoral (center); p-values are shown in Table 4

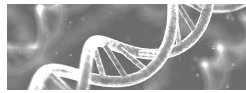


Table S2

Table S2. Cross-sectional differences among the mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups in quantitative parameters of cartilage structure collected in an additional and different cohort of (n=326) knee OA patients in the progression subcohort of the OAI with no follow-up (namely Project 18)

	mtDNA haplogroups									
	H (N=125)		J (N=37)		T (N=30)		Uk (N=75)		Others (N=55)	
	Mean (SD)	p-value	Mean (SD)	p-value	Mean (SD)	p-value	Mean (SD)	p-value	Mean (SD)	p-value
<i>Cartilage volume</i>										
MFTC.VCIAB	3.37 (0.80)	0.529	3.26 (0.90)	0.529	3.69 (0.93)	0.204	3.48 (0.89)	0.092	3.25 (0.76)	0.984
MT.VCIAB	1.63 (0.31)	0.306	1.57 (0.36)	0.306	1.79 (0.35)	0.072	1.69 (0.34)	0.127	1.59 (0.27)	0.927
cMF.VCIAB	1.74 (0.53)	0.776	1.68 (0.58)	0.776	1.91 (0.64)	0.454	1.80 (0.61)	0.120	1.66 (0.53)	0.980
MFTC.VC (x1000)	3.04 (0.89)	0.498	2.92 (1.04)	0.498	3.57 (1.16)	0.034*	3.30 (1.06)	0.041*	2.86 (0.88)	0.761
MT.VC (x1000)	2.02 (0.58)	0.365	1.93 (0.67)	0.365	2.36 (0.74)	0.033*	2.19 (0.67)	0.058	1.91 (0.55)	0.709
cMF.VC (x1000)	1.02 (0.37)	0.855	0.99 (0.41)	0.855	1.21 (0.50)	0.100	1.10 (0.45)	0.067	0.95 (0.37)	0.893
<i>Cartilage thickness</i>										
cMFTC.ThCIAB	4.25 (1.18)	0.645	4.09 (1.41)	0.645	4.76 (1.32)	0.133	4.41 (1.39)	0.061	4.08 (1.16)	0.949
MFTC.ThCIAB	3.37 (0.78)	0.413	3.24 (0.88)	0.413	3.69 (0.90)	0.191	3.46 (0.88)	0.131	3.25 (0.73)	0.989
aMT.ThCIAB	1.56 (0.33)	0.038*	1.45 (0.33)	0.038*	1.67 (0.40)	0.287	1.55 (0.32)	0.640	1.49 (0.32)	0.468
MT.ThCcAB	1.74 (0.27)	0.202	1.69 (0.29)	0.202	1.88 (0.28)	0.038*	1.80 (0.29)	0.182	1.69 (0.23)	0.526
cMT.ThCIAB	2.30 (0.55)	0.405	2.21 (0.70)	0.405	2.60 (0.59)	0.036*	2.39 (0.64)	0.125	2.24 (0.50)	0.933
ccMF.ThCIAB	1.94 (0.73)	0.993	1.88 (0.79)	0.993	2.15 (0.85)	0.544	2.02 (0.86)	0.081	1.85 (0.75)	0.844

Data are in millimetres (mm), except for MFTC.VC, MT.VC and cMF.VC that are shown in cubic millimetres (mm³); SD: standard deviation; MFTC.VCIAB: normalized cartilage volume in medial tibia femoral compartment; MT.VCIAB: normalized cartilage volume in medial tibia; cMF.VCIAB: normalized cartilage volume in central medial femoral; MFTC.VC: cartilage volume in medial tibia femoral compartment; MT.VC: volume of cartilage in medial tibia; cMF.VC: volume of cartilage in central medial femoral; aMT.ThCIAB: mean cartilage thickness in central medial tibia femoral compartment (weight bearing); MFTC.ThCIAB: mean cartilage thickness in medial tibia femoral compartment; cMT.ThCIAB: mean cartilage thickness in medial tibia (anterior); MT.ThCcAB: mean cartilage thickness in medial tibia; cMT.ThCIAB: mean cartilage thickness in medial tibia (center); ccMF.ThCIAB: mean cartilage thickness in central medial femoral (center); (#) Multivariate (ANCOVA) analysis adjusting for gender, age, previous surgery, mJNSN of the analyzed knee and body mass index (BMI) at baseline, and considering the most common mtDNA haplogroup H as the reference group; (*) indicates statistical significance (p ≤ 0.05)

7.3 ANEXO 3

Artículos complementarios

Osteoarthritis and Cartilage



Common variations in estrogen-related genes are associated with severe large-joint osteoarthritis: a multicenter genetic and functional study

J.A. Riancho †*, C. García-Ibarbia †, A. Gravani ‡, E.V.A. Raine ‡, C. Rodríguez-Fontenla §, A. Soto-Hermida ||, I. Rego-Perez ||, A.W. Dodd ‡, J.J. Gómez-Reino §, M.T. Zarrabeitia †, C.M. Garcés †, A. Carr ¶, F. Blanco ||, A. González §, J. Loughlin †

† Servicios de Medicina Interna, Medicina Legal and Cirugía Ortopédica, Hospital U.M. Valdecilla-IFIMAV, Universidad de Cantabria, RETICEF, Santander, Spain

‡ Newcastle University, Institute of Cellular Medicine, Musculoskeletal Research Group, Newcastle upon Tyne, UK

§ Laboratorio Investigación 10 and Unidad de Reumatología, Instituto de Investigación Sanitaria-Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain

|| INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, División de Reumatología, A Coruña, Spain

¶ University of Oxford, NDORMS, Oxford, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 January 2010

Accepted 14 April 2010

Keywords:

Osteoarthritis

Estrogens

Aromatase

Gene expression

Genetic association study

Multicenter study

SUMMARY

Objective: Several lines of evidence suggest that estrogens influence the development of osteoarthritis (OA). The aim of this study was to explore the association of two common polymorphisms within the aromatase (*CYP19A1*) and estrogen receptor (ER) alpha (*ESR1*) genes with severe OA of the lower limbs. **Methods:** The rs1062033 (*CYP19A1*) and rs2234693 (*ESR1*) single nucleotide polymorphisms were genotyped in 5528 individuals (3147 patients with severe hip or knee OA, and 2381 controls) from four centres in Spain and the United Kingdom. Gene expression was measured in femoral bone samples from a group of patients.

Results: In the global analysis, both polymorphisms were associated with OA, but there was a significant sex interaction. The GG genotype at rs1062033 was associated with an increased risk of knee OA in women [odds ratio (OR) 1.23; $P=0.04$]. The CC genotype at rs2234693 tended to be associated with reduced OA risk in women (OR 0.76, $P=0.028$, for knee OA; OR = 0.84, $P=0.076$ for hip OA), but with increased risk of hip OA in men (OR 1.28; $P=0.029$). Women with unfavourable genotypes at both loci had an OR of 1.61 for knee OA ($P=0.006$). The rs1062033 genotype associated with higher OA risk was also associated with reduced expression of the aromatase gene in bone.

Conclusions: Common genetic variations of the aromatase and ER genes are associated with the risk of severe OA of the large joints of the lower limb in a sex-specific manner. These results are consistent with the hypothesis that estrogen activity may influence the development of large-joint OA.

© 2010 Osteoarthritis Research Society International. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

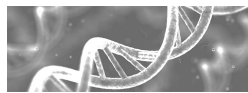
Osteoarthritis (OA) is a prevalent disorder that frequently impairs the quality of life in middle aged and elderly individuals and represents a considerable economical burden to health-care systems. Among individuals over 45 years of age, several studies have reported a prevalence of hip OA of between 7 and 27%, and of approximately 16% for knee OA¹. Joint replacement surgery, mostly at the hip and the knee, represents a major component of the activity of orthopaedic surgery departments, with the number of

operations expected to increase six-fold by the year 2030². Therefore, a better understanding of the pathophysiology of OA is important to establish effective preventive strategies. OA is currently seen as a complex disorder resulting from the interaction between acquired and genetic factors. The heritability of OA at different sites has been estimated to be approximately 75% at the spine, 65% at the hand, 60% at the hip, and 40% at the knee, with some suggestions for a more important contribution of heredity in females than in males^{3,4}. Although the damage to the cartilage is frequently emphasized in OA, there is evidence suggesting that changes to the synovium and the subchondral bone are also involved in the OA disease process⁵.

Estrogens are critical modulators of bone homeostasis, in females and in males⁶. They have also been shown to modulate chondrocyte activity and the synthesis of a variety of factors, including metalloproteinases, nitric oxide and reactive oxygen

* Address correspondence and reprint requests to: J.A. Riancho, Departamento de Medicina Interna, Hospital U.M. Valdecilla, Universidad de Cantabria, Av Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain. Fax: 34-942201695.

E-mail address: rianchoj@unican.es (J.A. Riancho).



species, involved in the anabolism and catabolism of the cartilage matrix^{7–10}. Estrogens act through the binding to two types of specific estrogen receptors (ERs), encoded by different genes: α (or *ESR1*) and β (or *ESR2*). *ESR1* seems to have a more consistent role in both sexes⁶. ERs are expressed by a variety of cells in the skeleton, including stromal cells, osteoblasts and chondrocytes¹¹. ER genes have been considered as appealing candidates potentially contributing to the genetic component of OA, but conflicting results have so been reported [recently reviewed by Ryder *et al.*¹²]. However, various studies suggest that estrogens may indeed influence the development of OA¹³; low levels of estrogens have been associated with an increased risk of OA in some studies¹⁴, whilst estrogen replacement therapy may have a protective role on the development of OA, both in experimental animals and in humans^{15–18}. In fact, increased osteophytosis has been reported in ER knock-out mice¹⁹. However, the protective effect of estrogens has not been demonstrated in all studies, and conflicting results have been reported in primate models of OA^{17,20,21}.

In postmenopausal women and in men, the aromatization of androgenic precursors in peripheral tissues is the main source of estrogens. The reaction is catalyzed by aromatase, the product of the *CYP19A1* gene, located on chromosome 15 (15q21.1). The synthesis of estrogens by aromatase-expressing bone cells may have important effects at the skeletal tissue level, independent of the circulating levels of estrogens. In fact, we have recently shown that aromatase expression is reduced in the bone tissue of patients with severe hip OA, in comparison to patients with hip fractures²². Therefore, we hypothesized that allelic variants of genes influencing estrogen synthesis and/or response could influence the risk of OA. The objective of this study was to explore the association of two common polymorphisms of the aromatase and ER α genes with primary OA of the lower limb.

Methods

Subjects

We studied 5528 individuals aged 55 years and older (2176 patients with hip OA, 971 patients with knee OA and 2381 controls) recruited at three centres in Spain (Santander, Santiago and Coruña) and one centre in the United Kingdom, Oxford (Table 1). The Spanish cohorts included Caucasian individuals of Spanish ancestry living in two regions in Northern Spain (Cantabria, Santander cohort; or Galicia, Santiago and Coruña cohorts). The Oxford cohort comprised individuals of Caucasian ethnicity from Oxford and from other parts of the UK. Patients had severe, radiographically confirmed, primary OA requiring hip or knee joint replacement surgery. Exclusion criteria included individuals with secondary OA (due to systemic diseases, rheumatoid arthritis, infections, trauma, ischemic necrosis, neurological diseases, etc.), who were excluded by clinical, laboratory and radiographic studies. The control group included volunteers recruited by voice and

Table 1
Characteristics of study subjects

	Santander	Coruña	Santiago	Oxford
Individuals (n)	1433	496	1014	2585
Controls (n)	802	244	473	862
Hip OA (n)	359	252	287	1278
Knee OA (n)	272	–	254	445
Age (mean, SD)				
Controls	71 ± 10	65 ± 13	68 ± 9	69 ± 7
Hip OA	71 ± 7	67 ± 14	68 ± 5	65 ± 6
Knee OA	72 ± 7	–	68 ± 6	64 ± 5
Sex (% women)	61	62	55	56

written announcements, patient's spouses, and individuals taking part in a cohort study of osteoporosis risk factors. They had no clinically evident OA at the lower extremities, but X-rays were not obtained routinely in the absence of a clinical justification. The study was approved by local ethics committees and all individuals gave informed written consent.

Genotyping

DNA was extracted from the peripheral blood or buccal swabs using standard procedures. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped; the rs1062033 SNP located in the 5' untranslated region (5'UTR) of the aromatase gene *CYP19A1* and the rs2234693 SNP located in intron 1 of the ER α gene *ESR1*. rs1062033 has been shown to be associated with differences in gene transcription at *CYP19A1* and with BMD in postmenopausal women^{23,24}, whilst rs2234693 has been suggested to influence OA risk in some studies^{25–27}. In the Santander and Oxford cohorts the SNPs were genotyped by TaqMan allelic discrimination assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as previously described²³. In the Santiago and Coruña cohorts they were genotyped by a single-base extension procedure, involving a multiplex polymerase chain reaction (PCR) (Qiagen Multiplex PCR, Valencia, CA, USA; oligonucleotide primer sequences and PCR conditions are available upon request) followed by single-base extension reactions performed with the SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems). In each laboratory, 5% samples were analyzed at least twice in different days to confirm the genotyping reproducibility. Twelve samples were genotyped in different laboratories to check the consistency of results with both genotyping methods. Alleles were designated according to the human reference sequences (minus strand for the *CYP19A1* gene, plus strand for the *ESR1* gene; Genome build 36.3).

Gene expression

CYP19A1 and *ESR1* expression was studied by real-time quantitative PCR, as previously described²². Biopsy samples were obtained from the femoral head removed during joint replacement for hip OA. Small fragments of trabecular bone were extensively washed with PBS, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C . Unthawed fragments were ground to a powder using a tissue homogenizer into Trizol (Invitrogen) to extract RNA, whose integrity was then monitored by gel electrophoresis and whose concentration was measured by absorptiometry. Aliquots of RNA (approximately 1 μg) were reverse transcribed with the Superscript III kit (Invitrogen), using random hexamers as primers. In negative control reactions reverse transcriptase was omitted. After reverse transcription, the expression of *CYP19A1* and *ESR1* was determined by real-time PCR in an ABI7300 apparatus (Applied Biosystems). The reactions were performed in triplicate in 96-well plates containing aliquots of cDNA obtained by reverse transcription, 5 μl of universal PCR master mix, and specific primers and probes for *CYP19A1* and *ESR1* (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems).

The cycle threshold (Ct) was determined. This represents the cycle at which a significant increase in fluorescence is first detected and is inversely related to the amount of target cDNA in the starting material. The results were normalized to *TBP* (TATA box binding protein) expression analyzed in the same reaction plate. Control samples of reverse transcribed reference human RNA (Stratagene, La Jolla, CA) were also included. The relative RNA levels were calculated using the formula $10 \times 2^{\Delta\text{Ct}1 - \Delta\text{Ct}2}$, where $\Delta\text{Ct}1$ is the difference between the control cDNA Ct and the sample cDNA Ct when the target gene (*CYP19A1*, *ESR1*) is amplified, and $\Delta\text{Ct}2$ is the

Table II
Genotype and allele frequencies in males and females (percentages in parentheses)

Cohort	Group	rs1062033				rs2234693			
		CC/CG	GG	C	G	TT/CT	CC	T	C
Males									
Santander	Control	182 (64)	103 (36)	0.36	0.64	229 (80)	56 (20)	0.55	0.45
	Knee OA	58 (61)	37 (39)	0.36	0.64	79 (83)	16 (17)	0.58	0.42
	Hip OA	109 (61)	71 (39)	0.35	0.65	133 (74)	47 (26)	0.50	0.50
Santiago	Control	190 (64)	105 (36)	0.34	0.66	250 (85)	45 (15)	0.62	0.38
	Knee OA	22 (47)	25 (53)	0.37	0.63	34 (72)	13 (28)	0.48	0.52
	Hip OA	76 (69)	34 (31)	0.31	0.69	91 (83)	19 (17)	0.59	0.41
Coruña	Control	67 (69)	30 (31)	0.46	0.54	79 (81)	18 (19)	0.56	0.44
	Knee OA	–	–	–	–	–	–	–	–
	Hip OA	63 (70)	27 (30)	0.46	0.54	72 (80)	18 (20)	0.59	0.41
Oxford	Control	330 (70)	141 (30)	0.46	0.54	385 (82)	86 (18)	0.55	0.45
	Knee OA	125 (71)	51 (29)	0.49	0.51	144 (82)	32 (18)	0.54	0.46
	Hip OA	363 (72)	140 (28)	0.47	0.53	395 (79)	108 (21)	0.56	0.44
Females									
Santander	Control	358 (69)	159 (31)	0.43	0.57	394 (76)	123 (24)	0.52	0.48
	Knee OA	107 (61)	70 (39)	0.40	0.60	140 (79)	37 (21)	0.53	0.47
	Hip OA	114 (64)	65 (36)	0.40	0.60	146 (82)	33 (14)	0.57	0.43
Santiago	Control	129 (73)	49 (27)	0.44	0.56	143 (80)	35 (20)	0.57	0.43
	Knee OA	132 (64)	75 (36)	0.43	0.57	174 (84)	33 (16)	0.55	0.45
	Hip OA	108 (61)	69 (39)	0.40	0.60	145 (82)	32 (18)	0.58	0.42
Coruña	Control	95 (65)	52 (35)	0.40	0.60	116 (79)	31 (21)	0.55	0.45
	Knee OA	–	–	–	–	–	–	–	–
	Hip OA	116 (72)	46 (28)	0.48	0.52	130 (80)	32 (20)	0.57	0.43
Oxford	Control	281 (72)	110 (28)	0.47	0.53	310 (79)	81 (21)	0.55	0.45
	Knee OA	188 (70)	81 (30)	0.46	0.54	224 (83)	45 (17)	0.56	0.44
	Hip OA	535 (69)	240 (31)	0.44	0.56	626 (81)	149 (19)	0.57	0.43

difference between control cDNA Ct and the sample cDNA Ct when the control gene (*TBP*) is amplified.

Data analysis

Hardy–Weinberg equilibrium in controls was tested with HWSIM software (<http://krunch.med.yale.edu/hwsim/hwsim.doc>). Differences in genotype distribution in each cohort and in the combined study population were analyzed with the χ^2 test and by unconditional logistic regression analysis after genotype grouping. As measures of association, the odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) were calculated for each cohort. The global OR combining all cohorts and the adjusted Mantel–Haenszel OR (weighted by each stratum variance) were calculated as summary estimates of effect. Assuming a minor allele frequency of 0.4, the study power to detect an effect size associated with an OR of at least 1.4 was higher than 90%, in the global and the sex-

stratified analysis, under a log-additive model. The non-parametric Jonckheere–Terpstra test for ordered categories was used to analyze the differences in gene expression between subjects with different genotypes. SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and EPIDAT software (<http://dxsp.sergas.es/ApliEdatos/Epilat/cas/default.asp>) were used in the statistical analyses. Study power calculations were done with QUANTO (<http://hydra.usc.edu/gxe>).

Results

Genetic variations and OA

In the whole study group, the genotype frequencies were similar to those reported in other Caucasian populations. The *CYP19A1* SNP rs1062033 genotypes were: CC 20%, CG 48%, and GG 32%. The *ESR1* SNP rs2234693 genotype frequencies were: TT 30%, TC 50%, CC 20%. There was no evidence for departure from the Hardy–Weinberg

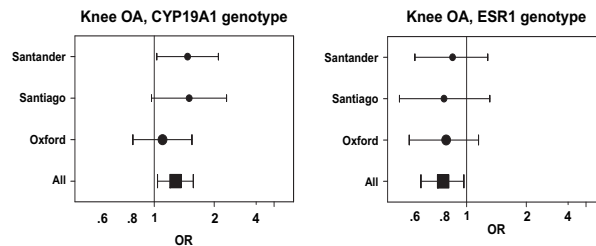


Fig. 1. Association of *CYP19A1* SNP rs1062033 GG genotype and *ESR1* SNP rs2234693 CC genotype with knee OA in women. The individual ORs, the global combined OR and the 95% CIs are shown.

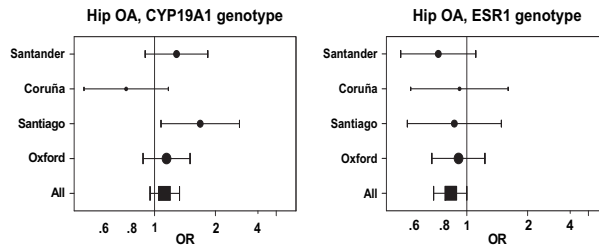
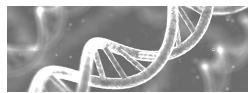


Fig. 2. Association of *CYP19A1* SNP rs1062033 GG genotype and *ESR1* SNP rs2234693 CC genotype with hip OA in women. The individual ORs, the global combined OR and the 95% CIs are shown.

equilibrium in the control groups ($P > 0.1$). The analyses of the unstratified data did not show significant differences in genotype distributions between cases and controls for either SNP. However, in sex-adjusted logistic regression models the genotypes at both SNPs were associated with OA (rs1062033, $P = 0.023$; rs2234693, $P = 0.03$), and there was a significant interaction between sex and the genotypes ($P = 0.04$ for *CYP19A1* and 0.006 for *ESR1*). Therefore, all subsequent analyses were stratified by sex. A dominant model for rs1062033 and a recessive model for rs2234693 best fitted the data. The genotype frequency distributions in the study cohorts are shown in Table II.

In women there was a consistent trend towards an increased risk of knee OA in those bearing the rs1062033 GG genotype. The global OR was 1.28 (95% CI 1.04–1.57; $P = 0.020$) and the combined Mantel–Haenszel OR was 1.32 (95% CI 1.06–1.63; $P = 0.011$), without evidence of heterogeneity between the three study populations ($P = 0.41$). On the other hand, women with the CC genotype at rs2234693 had a lower risk of knee OA, with a global OR of 0.76 (0.59–0.97; $P = 0.028$) and combined Mantel–Haenszel OR of 0.80 (0.62–1.02; $P = 0.08$), without evidence of heterogeneity ($P = 0.9$) (Fig. 1). Both SNPs were independently associated with the risk of knee OA, and there was no significant interaction between them. In the male subgroup, there were no significant associations between knee OA and either SNP (not shown).

Similarly, the GG genotype at rs1062033 was associated with a nonsignificant trend for increased risk of hip OA in women (OR 1.12, 95% CI 0.95–1.33, $P = 0.18$; Mantel–Haenszel OR 1.18, 95% CI 0.98–1.41, $P = 0.075$), with relatively wide between-study differences (heterogeneity P -value = 0.08; proportion of between-study variance to total variance $I^2 = 0.5$) (Fig. 2). As for knee OA, there was a consistent trend for lower risk of hip OA in women bearing the CC genotype at rs2234693, with a global OR of 0.84, almost reaching the conventional threshold for statistical significance (95% CI 0.69–1.02, $P = 0.07$; Mantel–Haenszel OR 0.86, 95% CI 0.70–1.06,

$P = 0.16$; heterogeneity P -value 0.8). In the male subgroup rs1062033 was not associated with hip OA. However, unlike women, men with the CC genotype at rs2234693 had a higher risk of hip OA, with a global OR of 1.28 (1.02–1.59; $P = 0.029$; Mantel–Haenszel OR 1.25; 95% CI 1.00–1.57, $P = 0.048$; heterogeneity P -value 0.9) (Fig. 3).

As shown in Table III, when the genotypes at both loci were combined, in women the gradient risk was somewhat higher than with any individual genotype, particularly for knee OA, with ORs between 1.24 and 1.61 for knee OA. In men the combined analysis did not generate more significant data than when the SNPs were analyzed individually (not shown).

CYP19A1 and *ESR1* expression

Gene transcription of *CYP19A1* and *ESR1* was studied in bone samples of 49 patients undergoing hip arthroplasty (29 men, 20 women) and the results were analyzed according to the donor's genotype. rs1062033 was associated with differences in the abundance of *CYP19A1* transcripts, which were more abundant in samples from individuals bearing C alleles than in those bearing G alleles (upper panel, Table IV). Intriguingly, significant differences in *CYP19A1* transcript abundance between individuals with different genotypes of rs2234693 were also observed (lower panel, Table IV). However, neither the rs2234693 genotypes nor the rs1062033 genotypes were associated with differences in the amount of *ESR1* transcripts in the bone samples (Table V).

Discussion

Estrogens are critical in the acquisition and maintenance of bone mass, in women as well as in men^{28,29}, and estrogen deficiency plays a major role in involutional osteoporosis. The possible role of estrogens in OA is less well established. However, several

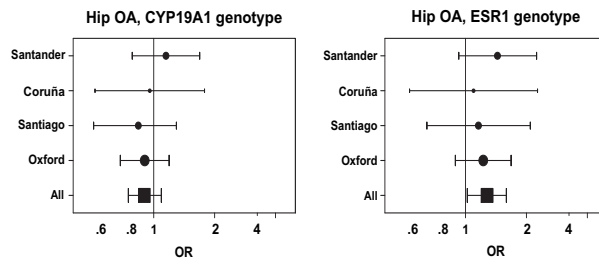


Fig. 3. Association of *CYP19A1* SNP rs1062033 GG genotype and *ESR1* SNP rs2234693 CC genotype with hip OA in men. The individual ORs, the global combined OR and the 95% CIs are shown.

Table III

Combined analysis of rs1062033 and rs2234693 genotypes in women

rs1062033 rs2234693	No-GG CC	No-GG No-CC	GG CC	GG No-CC	P-value	P-value for trend
Controls (n)	193	670	77	293		
Knee OA (n)	77	350	38	188		
OR	1	1.31 (0.97–1.75)	1.24 (0.77–1.98)	1.61 (1.16–2.22)	0.031	0.006
Hip OA (n)	156	717	90	330		
OR	1	1.32 (1.05–1.68)	1.45 (1.00–2.09)	1.39 (1.07–1.81)	0.063	0.051

experimental and epidemiological studies suggest that estrogen deficiency may favour the development of this disease³⁰. For instance, Sowers et al found an inverse relationship between serum levels of estradiol and the incidence of knee OA, even after adjustment for age and BMI¹⁴, but others did not confirm these results³¹. Likewise, conflicting results have been published regarding the possible preventive effect of hormone replacement therapy on OA^{32,15}.

Such conflicting results are not totally unexpected, as the local synthesis of estrogens in bone may have important effects in nearby tissue that are not captured by measuring circulating serum estradiol, whilst a single point measurement may not reflect adequately the overall exposure of skeletal cells to estrogens during the lifetime period. In this regard, it has been suggested that studies of genetic variants modulating the synthesis or activity of biological factors may be more informative than single measurements or even short interventional studies, as they originate the so-called "Mendelian randomization"^{33,34}. In this multicenter study we found that two common polymorphisms related to the estrogen pathway are associated with the risk of OA. Thus, women bearing a particular genotype at the aromatase-coding gene *CYP19A1* are at an increased risk for knee OA. The effect size was relatively small and not significant in individual cohorts, but it was consistent and statistically significant in the global analysis, with an OR greater than 1.2. The risk genotype was common, being present in about one third of the individuals genotyped. Therefore, it may have important consequences not only at the individual level, but also at the population level. This risk genotype was associated with reduced *CYP19A1* expression in bone samples from patients with OA, thus confirming previous results obtained in patients with fractures^{35,24}. We do not have data on estrogen levels, but we speculate that individuals with genotypes associated with reduced *CYP19A1* expression may have lower levels of aromatase and have therefore had a lower cumulative exposure to estrogens during their life. This would be consistent with the hypothesis that a relative estrogen deficiency, either local or systemic, may favour the development of OA^{13,36}, and with a recent report of reduced aromatase expression in OA²².

Aromatase is responsible for the synthesis of estrogens in postmenopausal women and in men³⁷. Its important role is emphasized by studies showing a marked decline in bone mass following therapy with aromatase inhibitors³⁸. On the other hand, type 1 estrogen receptors (ER α) are regarded as the main receptors transducing the

effect of estrogens on target cells. Based on previous results^{23,35,39}, we hypothesized that genetic variations of ER could also modulate the risk of OA. In fact, although to our knowledge the association of aromatase gene polymorphisms with OA has not been reported previously, several investigators have explored the relationship between *ESR1* genetic variants and OA^{25–27,40,41}. In common with several of these studies, we found that the *ESR1* SNP rs2234693 was also associated with the risk of OA in women, particularly at the knee (results for hip OA did not reach the conventional 0.05 statistical significance threshold) and with hip OA in men. The polymorphism is located in intron 1 and we speculated that it might influence gene transcription. However, we found no significant differences in the abundance of *ESR1* transcripts across the three *ESR1* genotypes. Interestingly, *ESR1* genotypes were associated with statistically significant differences in *CYP19A1* transcript abundance. There is no clear explanation for this result and it obviously merits further genetic and functional investigation; a relevant observation from other studies is that ER may have ligand-independent and ligand-dependent effects on the expression of genes including *CYP19A1*⁴², suggesting a trans-interaction between these two genes located in different chromosomes. Whatever the explanation might be, our results suggest that the alleles associated with lower aromatase levels are associated with an increased risk of OA. They do not prove a direct causal link between the genotypes and OA, but suggest that genotype-dependent differences in estrogen levels or action influence OA risk.

Although aromatase is critical for estrogen synthesis in both postmenopausal women and men, we observed an interaction between sex and the genotypes. Thus, whereas both rs1062033 and rs2234693 genotypes were associated with knee OA in women, in men rs1062033 genotypes were not associated with either hip or knee OA, and rs2234693 genotypes were associated with hip OA, but in an opposite direction to that observed in women. The exact mechanisms explaining the sex-related differences are unclear. They may be the consequence of differences in the relative importance of acquired factors (such as physical activity) in men and women, or reflect some sex-specific responses to changes in estrogen levels, similar to what is observed in aromatase knock-out mice and in experimental models of OA^{43,44}.

This multicenter study included a large number of individuals, which allowed us to increase the precision of the estimates of the genetic effects. However, it had several limitations. First, we did not systematically obtain X-rays of the control subjects. Therefore,

Table IV

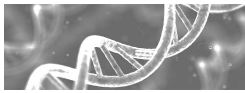
CYP19A1 gene expression according to *CYP19A1* and *ESR1* genotypes. Values are means \pm SEM (arbitrary units) and 95% CIs in parentheses

<i>CYP19A1</i> genotype	CG (n = 21)	GG (n = 21)	P-value
CC (n = 8)	15.5 \pm 3.4 (8.7–22.3)	11.4 \pm 2.9 (5.8–17.0)	0.036
<i>ESR1</i> genotype	TC (n = 28)	GG (n = 7)	P-value
TT (n = 14)	16.7 \pm 3.1 (10.6–22.8)	23.6 \pm 9.2 (5.6–41.6)	0.011
	8.4 \pm 2.4 (3.7–13.1)		

Table V

ESR1 gene expression according to *CYP19A1* and *ESR1* genotypes (data on 37 subjects). Values are means \pm SEM (arbitrary units) and 95% CIs in parentheses

<i>CYP19A1</i> genotype	CG (n = 16)	GG (n = 17)	P-value
CC (n = 4)	13.2 \pm 6.2 (1.1–25.3)	5.1 \pm 1.4 (2.3–7.9)	0.22
<i>ESR1</i> genotype	TC (n = 18)	GG (n = 6)	P-value
TT (n = 13)	11.8 \pm 5.6 (0.9–22.7)	4.4 \pm 2.1 (2.7–6.1)	0.90
	5.9 \pm 1.7 (2.6–9.2)		



some of them may have mild asymptomatic OA, which could bias the results towards the null effect. On the other hand, although we excluded cases with secondary OA, we had limited information about anthropometric, nutritional and other environmental factors that may influence the risk of OA. Therefore, we could not explore possible interactions between genetic and acquired factors that can be important in OA.

In conclusion, in this multicenter study we have shown that common genetic variation of the aromatase gene *CYP19A1* and the ER gene *ESR1*, which are associated with gene expression, are also associated with the risk of severe OA of the large joints of the lower limb. The sex-stratified analysis suggested that the influence of the *CYP19A1* SNP is more important in women than in men, and in knee OA than in hip OA. On the other hand, the *ESR1* SNP may have a sex-specific influence on OA risk. Overall, these results are consistent with the hypothesis that estrogen activity may influence the development of large-joint OA.

Author contributions

Conception and design: JAR, JL.
Provision of patients and samples: CMG, JJGR, AC, AP, IRP.
Clinical and laboratory data acquisition: CGI, AG, EAR, CRF, JJB, IRP AD, JJGR, CMG, AC.
Genotyping supervision: MTZ, AG, FB, JL, IRP.
Data analysis and interpretation: JAR, JL, AG, FB.
Drafting of the article: JAR, JL, AG, FB.
Final approval of the article: all coauthors.
Obtaining of funding: JAR, JL, AG, FB.
Study coordination and responsibility for the integrity of the work: JAR.

Conflicts of interest

Authors do not have conflicts of interest relevant to this paper.

Acknowledgements

We acknowledge the technical assistance of Verónica Mijares, Carolina Sañudo and Carmen Pena-Pena. We thank Bridget Watkins and Kim Clipsham for their assistance in the collection of the Oxford cohort.

Funding sources: this study was supported in part by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias-ISCIII (PI 06/0034 and PI08/2028), by the Arthritis Research UK, by the UK NIHR Biomedical Research Centre for Ageing and Age-related disease award to the Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, by the Dr William Harker Foundation, by the UK NIHR Musculoskeletal Biomedical Research Unit in Oxford, by the Collisson and Jean Shanks Foundations and by grants from the Xunta de Galicia. C. R-F is the recipient of a predoctoral contract of the ISCIII.

References

- Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2008;34:515–29.
- Bitton R. The economic burden of osteoarthritis. *Am J Manag Care* 2009;15:S230–5.
- Loughlin J. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:111–6.
- Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12(Suppl A):S39–44.
- Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 2007;213:626–34.
- Syed FS, Khosla S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:688–96.
- Sniekers YH, van Osch GJ, Jahr H, Weinans H, van Leeuwen JP. Estrogen modulates iodoacetate-induced gene expression in bovine cartilage explants. *J Orthop Res* 2009.
- Richette P, Dumontier MF, Tahiri K, Widerak M, Torre A, Benallaoua M, et al. Estrogens inhibit interleukin-1{beta}-mediated nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes through NF-(kappa)B impairment. *Ann Rheum Dis* 2007;66:345–50.
- Claassen H, Schluter M, Schunke M, Kurz B. Influence of 17beta-estradiol and insulin on type II collagen and protein synthesis of articular chondrocytes. *Bone* 2006;39:310–7.
- Claassen H, Schunke M, Kurz B. Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage. *Cell Tissue Res* 2005;319:439–45.
- Oshima Y, Matsuda K, Yoshida A, Watanabe N, Kawata M, Kubo T. Localization of estrogen receptors alpha and beta in the articular surface of the rat femur. *Acta Histochem Cytochem* 2007;40:27–34.
- Ryder JJ, Garrison K, Song F, Hooper L, Skinner J, Loke Y, et al. Genetic associations in peripheral joint osteoarthritis and spinal degenerative disease: a systematic review. *Ann Rheum Dis* 2008;67:584–91.
- Richette P, Corvol M, Bardin T. Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2003;70:257–62.
- Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, Buyuktur AG, Hochberg M, Jamadar DA. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:2481–7.
- Cirillo DJ, Wallace RB, Wu L, Yood RA. Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the Women's Health Initiative. *Arthritis Rheum* 2006;54:3194–204.
- Ravn P, Warming L, Christgau S, Christiansen C. The effect on cartilage of different forms of application of postmenopausal estrogen therapy: comparison of oral and transdermal therapy. *Bone* 2004;35:1216–21.
- Ham KD, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS. Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in cynomolgus monkeys. *Arthritis Rheum* 2002;46:1956–64.
- Ma HL, Blanchet TJ, Peluso D, Hopkins B, Morris EA, Glasson SS. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:695–700.
- Sniekers YH, van Osch GJ, Ederveen AG, Inzunza J, Gustafsson JA, van Leeuwen JP, et al. Development of osteoarthritic features in estrogen receptor knockout mice. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:1356–61.
- Olson EJ, Lindgren BR, Carlson CS. Effects of long-term estrogen replacement therapy on the prevalence and area of periarticular tibial osteophytes in surgically postmenopausal cynomolgus monkeys. *Bone* 2007;41:282–9.
- Sniekers YH, Weinans H, Bierma-Zeinstra SM, van Leeuwen JP, van Osch GJ. Animal models for osteoarthritis: the effect of ovariectomy and estrogen treatment – a systematic approach. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:533–41.
- Hernandez JL, Garcés CM, Sumillera M, Fernandez-Aldasoro EV, Garcia-Ibarbia C, Ortiz JA, et al. Aromatase expression in osteoarthritic and osteoporotic bone. *Arthritis Rheum* 2008;58:1696–700.
- Riancho JA, Zarrabeitia MT, Valero C, Sanudo C, Mijares V, Gonzalez-Macias J. A gene-to-gene interaction between aromatase and estrogen receptors influences bone mineral density. *Eur J Endocrinol* 2006;155:53–9.
- Riancho JA, Sanudo C, Valero C, Pipaon C, Olmos JM, Mijares V, et al. Association of the aromatase gene alleles with BMD: epidemiological and functional evidence. *J Bone Miner Res* 2009;24:1709–18.

25. Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Nishioka J, Ohkubo I, Hukuda S. Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis. *J Rheumatol* 1998;25:134–7.
26. Lian K, Lui L, Zmuda JM, Nevitt MC, Hochberg MC, Lee JM, et al. Estrogen receptor alpha genotype is associated with a reduced prevalence of radiographic hip osteoarthritis in elderly Caucasian women. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:972–8.
27. Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J, Arp PP, Fang Y, Hofman A, et al. Estrogen receptor alpha gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. *Arthritis Rheum* 2003;48:1913–22.
28. Khosla S, Melton LJ, Riggs BL. Estrogen and the male skeleton. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1443–50.
29. Riggs BL, Khosla S, Melton III LJ. Sex steroids and the construction and conservation of adult skeleton. *Endocr Rev* 2002;23:279–302.
30. Roman-Blas JA, Castaneda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther* 2009;11:241.
31. de Klerk BM, Schiphof D, Groeneveld FP, Koes BW, van Osch GJ, van Meurs JB, et al. No clear association between female hormonal aspects and osteoarthritis of the hand, hip and knee: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:1160–5.
32. de Klerk BM, Schiphof D, Groeneveld FP, Koes BW, van Osch GJ, van Meurs JB, et al. Limited evidence for a protective effect of unopposed oestrogen therapy for osteoarthritis of the hip: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:104–12.
33. Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from Mendelian randomisation. *Lancet* 2005;365:224–32.
34. Smith GD, Ebrahim S. Mendelian randomization: prospects, potentials, and limitations. *Int J Epidemiol* 2004;33:30–42.
35. Valero C, Perez-Castrillon JL, Zarrabeitia MT, Hernandez JL, Alonso MA, Pino-Montes J, et al. Association of aromatase and estrogen receptor gene polymorphisms with hip fractures. *Osteoporos Int* 2008;19:787–92.
36. Li F, Yu S, Feng X, Wang H, Fu S, Ding Y. Locally synthesized estrogen: a novel target in the development of OA. *Med Hypotheses* 2009;73:144–6.
37. Simpson ER. Role of aromatase in sex steroid action. *J Mol Endocrinol* 2000;25:1549–56.
38. McCloskey E. Effects of third-generation aromatase inhibitors on bone. *Eur J Cancer* 2006;42:1044–51.
39. Leskela HV, Olkku A, Lehtonen S, Mahonen A, Koivunen J, Turpeinen M, et al. Estrogen receptor alpha genotype confers interindividual variability of response to estrogen and testosterone in mesenchymal-stem-cell-derived osteoblasts. *Bone* 2006;39:1026–34.
40. Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, Doherty M, et al. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum* 2006;54:533–9.
41. Jin SY, Hong SJ, Yang HI, Park SD, Yoo MC, Lee HJ, et al. Estrogen receptor-alpha gene haplotype is associated with primary knee osteoarthritis in Korean population. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R415–21.
42. Chen S, Ye J, Kijima I, Kinoshita Y, Zhou D. Positive and negative transcriptional regulation of aromatase expression in human breast cancer tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;95:17–23.
43. Kinney RC, Schwartz Z, Week K, Lotz MK, Boyan BD. Human articular chondrocytes exhibit sexual dimorphism in their responses to 17beta-estradiol. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:330–7.
44. Oz OK, Zerwekh JE, Graves K, Nanu L, Millsaps R, Simpson ER. Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency. *J Bone Miner Res* 2000;15:507–14.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and serum levels of anti-oxidant enzymes in patients with osteoarthritis

Mercedes Fernandez-Moreno¹, Angel Soto-Hermida¹, Sonia Pertega², Natividad Oreiro¹, Carlos Fernandez-Lopez¹, Ignacio Rego-Perez^{1†} and Francisco J Blanco^{1,3*†}

Abstract

Background: Oxidative stress play a main role in the initiation and progression of the OA disease and leads to the degeneration of mitochondria. To prevent this, the chondrocytes possess a well-coordinated enzymatic antioxidant system. Besides, the mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups are associated with the OA disease. Thus, the main goal of this work is to assess the incidence of the mtDNA haplogroups on serum levels of two of the main antioxidant enzymes, Manganese Superoxide Dismutase (Mn-SOD or SOD2) and catalase, and to test the suitability of these two proteins for potential OA-related biomarkers.

Methods: We analyzed the serum levels of SOD2 and catalase in 73 OA patients and 77 healthy controls carrying the haplogroups J, U and H, by ELISA assay. Knee and hip radiographs were classified according to Kellgren and Lawrence (K/L) scoring from Grade 0 to Grade IV. Appropriate statistical analyses were performed to test the effects of clinical variables, including gender, body mass index (BMI), age, smoking status, diagnosis, haplogroups and radiologic K/L grade on serum levels of these enzymes.

Results: Serum levels of SOD2 appeared statistically increased in OA patients when compared with healthy controls ($p < 0.001$). Even in those OA patients with higher OA severity (K/L grade IV), the serum levels of this antioxidant enzyme appeared more significantly increased than in OA patients with lower K/L grade ($p < 0.001$). The mtDNA haplogroups showed an influence on serum levels of catalase ($p = 0.054$), being carriers of the mtDNA haplogroup J those who showed higher serum levels than non-J carriers ($p = 0.057$).

Conclusions: The increased levels of SOD2 in OA patients indicate an increased oxidative stress OA-related, therefore this antioxidant enzyme could be a suitable candidate biomarker for diagnosis of OA. Mitochondrial haplogroups significantly correlates with serum levels of catalase

Background

Osteoarthritis (OA), the most common joint disease and cause of musculoskeletal disability in elderly people, is characterized by late-onset degeneration of articular cartilage, leading to joint destruction and severe impairment of mobility [1]. It is also the main cause of work incapacity and one of the most common reasons for visiting primary physicians. The metabolic and structural changes that take place in the articular cartilage,

including the oxidative stress, are thought to play a main role in the initiation and progression of this disease.

Actually, OA-related molecular biomarkers are being developed with the aim of detecting the progression of OA with more reliability and sensitivity, preferably early in the disease process [2,3]. Because of their greater sensitivity compared with radiographs, several molecular markers for bone, cartilage and synovial have been described as useful for the early identification of OA and of patients at high risk for progression, for monitoring disease progression, and for assessing therapeutic response [3-6]. In this sense, our group has recently

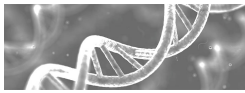
* Correspondence: fblagar@sergas.es

† Contributed equally

¹Osteoarticular and Aging Research Lab. Rheumatology Division. INIBIC-Hospital Universitario A Coruña. Spain

Full list of author information is available at the end of the article





added new candidate genetic biomarkers, the mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups, which we suggest can be useful as complementary factors when the classical OA-related molecular biomarkers are analyzed.

The mtDNA haplogroups have been associated not only with several multifactorial diseases [7-9] and ageing [10,11], but also with a lower prevalence and severity of knee and hip OA [12,13]. Besides, they modulate the serum levels of some collagen type-II molecular biomarkers [14] as well as some proteolytic enzymes, such as metalloproteinases [15]. The proposed mechanism relies on the different metabolic characteristics of these haplogroups, reflected by the performance of the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) of each haplogroup [7,16]. The OXPHOS system is a mitochondrial metabolic pathway that uses energy released by the oxidation of nutrients to produce adenosine triphosphate (ATP) as electrons are transferred from electron donors to electron acceptors, such as oxygen, in redox reactions. These redox reactions, carried out by a series of protein complexes within mitochondria, release energy which is used to form ATP.

The different metabolic characteristics make haplogroup J carriers to show not only lower serum levels of catabolic OA-related biomarkers when compared with those carriers of the haplogroup H [14] but also lower oxygen consumption and lower oxidative damage [17].

As mentioned above, elevated levels of oxidative stress occur in OA and aged cartilage [18]. Although reactive oxygen species (ROS) are involved in the control of various aspects of biological processes in chondrocytes as intracellular second messenger molecules [19], elevated production of ROS leads to i) telomere instability and downregulation of chondrocyte function [20], ii) increased inflammatory response [21], iii) cartilage degradation, by cleaving collagen and aggrecan and activating matrix metalloproteinases (MMPs) [22], and iv) cell death [23]. Oxidative stress also results in the degeneration of mitochondria, the main source of ROS, leading to a leakage of oxidative chain and significant damage to the mitochondrial genome and reduced mtDNA capacity for repair [24].

To prevent an accumulation of ROS-mediated damage, chondrocytes possess a well-coordinated enzymatic antioxidant system formed principally by superoxide dismutases (SODs), catalase and glutathione peroxidase (GPX). SOD2 and SOD3 has been shown to be downregulated in OA cartilage [25-27]; and catalase activity was shown to be increased in OA patients compared with healthy controls [28].

In summary, taking into account the incidence of the oxidative stress in the OA process, as well as the incidence of the mtDNA haplogroups in both the

performance of the OXPHOS system and in the OA disease, even on serum levels of classical OA-related molecular biomarkers and proteolytic enzymes, the aim of this work is to perform a retrospective study to evaluate the effects of the mtDNA haplogroups on serum levels of SOD2 and catalase, as well as to test the suitability of these two proteins for potential OA-related biomarkers. The study population is a previously described cohort of OA patients and healthy controls from the north of Spain, consisted in 73 OA subjects and 77 healthy controls carrying the mtDNA haplogroups J, U or H [14].

Methods

Subjects

The population analyzed in this study has been described previously [14]. A total of 73 unrelated patients diagnosed with knee or hip OA (25 carrying haplogroup J, 25 carrying haplogroup U and 23 carrying haplogroup H) were included in the present study. Patients meeting the inclusion criteria for this study included individuals of both sexes (52 females; 21 males), older than 41-years-old (mean age: 67.74 ± 8.96 years-old; range: 51-95), and diagnosed with OA following the American College of Rheumatology (ACR) criteria [29]. Knee and hip radiographs from 148 subjects were classified according to Kellgren and Lawrence (K/L) scoring from Grade 0 to Grade IV [30]. Only those joints of OA patients diagnosed with OA were examined for presence of radiographic OA. Of the 77 subjects who met the inclusion criteria for normal subjects, 25 carried haplogroup J, 25 haplogroup U and 27 haplogroup H. These control subjects included 39 females and 38 males older than 41-years-old (mean age: 66.01 ± 11.88 years-old; range: 42-94), who did not meet the ACR criteria for knee or hip OA. In all cases, informed consent and the agreement of the ethical committee from Galician Health Administration were obtained.

mtDNA haplogroups genotyping

The samples obtained for the study were haplogroup-typed using a previously described assay [12]. Briefly, a multiplex PCR for the amplification of 6 mtDNA fragments that contain 6 informative mtDNA single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed, followed by a single base extension assay (SBE) prior purification of the amplified PCR products. Finally, the fragments were run in an automatic DNA sequencer (ABI 3130XL) to assign the mtDNA haplogroups based on the combination of the informative mtDNA SNPs. For this study, only subjects carrying mtDNA haplogroups J, H or U were included.

Molecular biomarkers

Fasting blood samples were collected from each subject in plain tubes containing separation gel. These were

allowed to stand for 20 minutes, then centrifuged for 10 minutes at 800 g. The serum was then divided into aliquots and stored at -80°C pending assay.

For this study, the serum levels of two antioxidant enzymes were measured: SOD2 and catalase. They were measured in our facilities using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) according to the manufacturer's recommendations. Serum SOD2 levels were measured using a kit from ABfrontier (Republic of Korea) and catalase was measured using a Camel catalase ELISA kit from Cusabio Biotech (Wuhan, China).

Determination of the serum levels of these enzymes was performed by simultaneously assaying OA patients and healthy controls, regardless of the mtDNA haplogroup.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software, release 17 (Chicago, USA). In univariate analysis, a non-parametric study was performed utilizing the Mann-Whitney *U*-test to compare serum molecular marker concentrations between OA patients and healthy controls. The Kruskal-Wallis test was used to compare molecular marker concentrations among the three haplogroups (J, U and H) regardless of the diagnosis. To look for possible correlations among the two enzymes analyzed, a correlation analysis using Spearman's Rho was used. In all cases, the Bonferroni correction for multiple comparisons was applied. Thus, *p*-values were obtained after multiplying the number of outcomes tested by the number of haplogroups ($k = 2 \times 3$).

Following these preliminary analyses, an analysis of covariance (ANCOVA) was used to evaluate the effects on enzyme serum levels (dependent variable) of each of the haplogroups as well as diagnosis, adjusting for the confounder effects of gender, body mass index (BMI), smoking status and age. When a significant effect was found either in haplogroups or in diagnosis, the conservative Bonferroni post hoc multiple comparisons test was performed to compare group means. If the interaction between diagnosis and haplogroup was statistically significant main effects should not be interpreted, so

differences among the $2 \times 3 = 6$ possible combinations of diagnosis (OA and healthy control) and haplogroups (H, J and U) were analyzed by using the same Bonferroni post hoc multiple comparisons test. Before the multivariate analysis, a distribution analysis using the Kolmogorov-Smirnov test showed that the both SOD2 and catalase were not normally distributed; therefore, their concentrations were square and log transformed respectively to obtain a normal distribution. Model diagnostic statistics were also analysed using residual plots.

The influence of radiographic grade to the serum levels of the molecular markers was tested using the non-parametric Jonckheere-Terpstra test for ordered groups. For this approach we obtained the radiographic grade of 148 subjects out of the 150 that are part of the study. Using K/L scores, subjects were divided into three radiographic groups: group A included 77 healthy controls (K/L grade 0 and grade I), group B consisted of 47 OA patients with K/L grades II and III, and group C included 24 OA patients with K/L grade IV.

Results

Non-parametric analysis of serum levels of the molecular markers

We first compared the serum levels of the enzymes assayed between OA patients and healthy controls. The results showed that levels of SOD2 were significantly increased in OA patients ($p < 0.001$) (Table 1). Serum levels of catalase showed a non significant trend toward increased values in OA patients, compared to healthy controls (Table 1).

Interestingly, the haplogroups have a significant influence on serum levels of catalase regardless of diagnosis, so that carriers of haplogroup J showed higher levels of catalase ($p = 0.054$). Regarding to SOD2, the results did not reach the statistical significance, but a trend toward decreased serum levels in carriers of haplogroup H compared with non-H carriers was detected (Table 2).

When we compared the three groups based on the K/L score, only SOD2 showed a significant trend towards proportionally higher serum levels in both groups B (K/L grade II and III) and C (K/L grade IV) than in group

Table 1 Serum levels of molecular markers in healthy controls and osteoarthritis (OA) patients

Markers	Healthy controls (n = 77)		OA (n = 73)		p*
	Mean (SD)	Median	Mean (SD)	Median	
SOD2 (ng/mL)	20.83 (30.81)	13.50	36.38 (11.16)	36.41	< 0.001**
Catalase (ng/mL)	14.50 (27.68)	5.03	21.88 (40.94)	8.00	0.189

(*) Mann-Whitney non-parametric *U*-test

(**) indicates statistical significance after Bonferroni correction ($p \leq 0.05$)

SD = Standard deviation

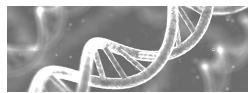


Table 2 Serum levels of molecular markers in the mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups H, U and J

Markers	Haplogroup H (n = 50)		Haplogroup U (n = 50)		Haplogroup J (n = 50)		p*
	Mean (SD)	Median	Mean (SD)	Median	Mean (SD)	Median	
SOD2 (ng/mL)	23.27 (13.92)	24.88	31.34 (34.52)	26.29	30.70 (19.60)	30.68	0.149
Catalase (ng/mL)	21.20 (37.49)	5.22	8.37 (11.34)	4.37	25.14 (45.42)	8.57	0.054**

(*) Kruskal-Wallis non-parametric test

(**) indicates statistical significance after Bonferroni correction ($p \leq 0.05$)

SD = Standard deviation

A (K/L grade 0 and I) ($p < 0.001$) (Table 3). Finally, no significant correlations among the serum levels of these two enzymes were detected.

Multiple regression analysis

We then performed a multiple regression analysis to assess the effects of the mtDNA haplogroups and clinical variables including gender, age, BMI, smoking status and diagnosis on the serum levels of the enzymes analyzed.

The results obtained for SOD2 showed that serum levels of this antioxidant enzyme were significantly increased in OA patients compared to healthy controls ($p < 0.001$). On the contrary, no significant influence of the mtDNA haplogroups neither significant interactions between mtDNA haplogroups and diagnosis were detected (Table 4).

The results of the multiple regression analysis for catalase showed that serum levels were slightly modulated by the mtDNA haplogroup J, bordering on the statistical significance, so that carriers of this haplogroup have higher levels than non carriers ($p = 0.057$) (Table 4). On the contrary, carriers of the mtDNA haplogroup U showed a non-significant trend towards lower levels of catalase than non-U carriers ($p = 0.075$) (Table 4). However, as described for SOD2, no significant

interactions between mtDNA haplogroups and diagnosis were found.

Discussion

In this study we analyzed whether some biomarkers related to the oxidative stress are modulated by the mtDNA haplogroups in the context of the OA disease. The choice of the mtDNA haplogroups J and U was due to their role in the prevalence and severity of knee and hip OA [12,13]; the mtDNA haplogroup H was also selected because is the most frequent mtDNA haplogroup in European populations [31].

Both SOD2 and catalase are two of the main members of the well-coordinated enzymatic antioxidant system in chondrocytes since ROS are, besides matrix metalloproteinases, the main biochemical factors of cartilage degradation [32]. Briefly, SOD2 catalyses the dismutation of superoxide anion (O_2^-) to oxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2), and this H_2O_2 in turn is eliminated by catalase, the most efficient enzyme for the degradation of H_2O_2 , or by glutathione peroxidase. An imbalance in this coordinated system will lead to the increased oxidative stress that takes place in the OA disease.

mtDNA haplogroups have been described to be involved in the development of the OA disease [12,13],

Table 3 Demographics of the study population and serum levels of enzyme markers grouped by radiological severity (Kellgren/Lawrence Score) and distribution of the haplogroups H, U and J in the 3 radiographic groups

Markers	Healthy controls (n = 77)		OA patients (n = 73)		Group A (n = 77)		Group B (n = 47)		Group C (n = 24)		p*
	Mean (SD)	Median	Mean (SD)	Median	Mean (SD)	Median	Mean (SD)	Median	J-T		
Mean age (range)	66.01 years-old (42-94)		67.74 years-old (51-95)		K/L grade 0 and I		K/L grade II and III		K/L grade IV		
Females/Males	39 females/38 males		52 females/21 males								
Haplogroup H, n(%)	25 (32.5)		18 (38.3)								
Haplogroup U, n(%)	25 (32.5)		12 (25.5)								
Haplogroup J, n(%)	27 (35)		17 (36.2)								
SOD2 (ng/mL)	20.83 (30.81)	13.50	35.75 (10.44)	35.02	38.10 (12.74)	39.23	7.796			< 0.001**	
Catalase (ng/mL)	14.50 (27.68)	5.03	22.82 (42.49)	8.56	20.58 (38.87)	8.00	1.227			0.220	

Group A: K/L grade 0 and I; Group B: K/L grade II and III; Group C: K/L grade IV

(*) Jonckheere-Terstra (J-T) non-parametric test

J-T = established J-T statistic

(**) indicates statistical significance after Bonferroni correction ($p \leq 0.05$)

SD = Standard deviation

Table 4 p values from the ANOVA table for the analysis of covariance of serum levels of the two enzymes analyzed

Variable	SOD2	Catalase
Gender	0.422	0.536
Age	0.800	0.211
BMI	0.655	0.471
Smoking status	0.785	0.084
Diagnosis	< 0.001*	0.249
Haplogroups:		
Haplogroup H (vs non-H)	0.133	0.894
Haplogroup J (vs non-J)	0.580	0.057*
Haplogroup U (vs non-U)	0.354	0.075
Diagnosis X Haplogroup	0.488	0.883

(*) indicates statistical significance ($p \leq 0.05$)

as well as in the modulation of the serum levels of classical collagen type-II molecular biomarkers [14] and proteolytic enzymes [15], probably due to their different OXHPoS performance [7,16] and the differences in the oxidative damage and oxygen consumption among them [17]. These particular characteristics make that some of these haplogroups show a lower ROS production and apoptosis [33,34], hence their involvement on serum levels of certain antioxidant proteins is a matter of relevance.

The results obtained in this work showed that SOD2 was significantly increased in OA patients, even those OA patients with higher radiographic grade showed the highest values too; meanwhile catalase showed a trend toward higher levels in the OA group, but did not reach the statistical significance. The results obtained also showed an influence of the mtDNA haplogroups on serum levels of catalase, so that those carriers of the mtDNA haplogroup J showed higher levels of catalase than non-J carriers regardless of diagnosis.

Despite some authors showed a downregulation of SOD2 in OA cartilage [27,35], the increased serum levels of this enzyme in OA patients showed in this work reflect an increased oxidative stress OA-related, as described by other authors [36]; besides, the deleterious effects of increased SOD2 have been supported in various studies [37]. However, serum levels of catalase were non-significantly increased in OA patients, notwithstanding the fact that catalase has greater stability than SOD2 [28,32]; on the contrary, catalase was increased in carriers of haplogroup J, showing a different pattern than for SOD2.

Despite the influence of the haplogroup J on serum levels of catalase, the potential role of the mtDNA haplogroups on serum levels of these two antioxidant enzymes seems slight, contrarily to the observed in both collagen type II biomarkers and proteolytic enzymes

[14,15]. Hence, a future approach will be to analyze the serum levels of these two antioxidant enzymes in a prospective larger cohort of samples to ascertain their increased serum levels in OA patients and therefore to validate their suitability as candidate OA biomarkers, and even their modulation by the mtDNA haplogroups.

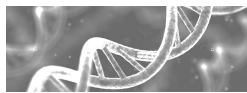
Attending to the "BIPED" (Burden of disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of intervention and Diagnostic) biomarker classification [38], SOD2 could be considered as a diagnostic marker pending validation, and also a burden of disease marker since, as shown in this study, its serum levels are significantly different attending to the K/L score. Regarding to the mtDNA haplogroups, they could be considered as investigative markers because, although their combination with some of the OA-related biomarkers seems to influence their behaviour, to increase information and replicate the findings to allow inclusion into one of the existing categories is still necessary. Otherwise, because we did not find significant differences in serum levels of catalase between OA patients and healthy controls, we consider this potential biomarker as another investigative one.

Biochemical markers of cartilage degradation have received much attention in comparison with others; overall, uCTX-II and sCOMP had the best performance of all currently biochemical markers, they were investigated most frequently and broadly, and scored in the higher ranges of scores form most "BIPED" categories; however, none of the current biochemical markers is sufficiently discriminating to aid diagnosis and/or prognosis of OA, attending to a systematic review carried out by Spil van and collaborators [39].

This study show some limitations that must be considered. This is a retrospective study in which the selection of the samples was based on the availability of serum samples carrying the mtDNA haplogroups J, U or H with no criterion when obtaining the serum samples; in this sense, it must be pointed out that, for serological analysis, the standardization of sample collection may improve biochemical marker performance since diurnal rhythms and influences of exercise have been described for several biochemical markers [40,41]; besides, repeated thawing and freezing must be avoided in order to obtain reliable results. Otherwise, the sample size may be small when multiple analysis are performed, and specially if we compare with larger GWAS studies, although this work is not. Hence, more samples must be analyzed to replicate these findings, and therefore we have initiated a new prospective collection of samples to try to replicate the findings showed in this study.

Conclusions

To our knowledge, this is the first work that correlates the serum levels of these enzymes with the mtDNA



haplogroups in the context of the OA disease. In summary, this work highlights the significantly increased serum levels of SOD2, an important antioxidant enzyme, in OA patients, demonstrating the existence of oxidative stress. Besides, serum levels of catalase are slightly increased in carriers of the mtDNA haplogroup J, when compared with non-J carriers. As described for both type II collagen biomarkers and some proteolytic enzymes OA-related, the influence of the haplogroups on the serum levels of catalase could arise from the different metabolic characteristics of these mitochondrial variants, that make some of them showed a different performance of the OXPHOS system [7,16]. Similarly, since serum levels of SOD2 are significantly decreased in healthy controls and significantly increased in OA patients with K/L grade IV, the use of SOD2 as a candidate biomarker for diagnosis of OA is proposed. However, a new prospective study must be performed in order to replicate these findings.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Fundación Española de Reumatología (programa GEN-SER) and from Fondo Investigación Sanitaria (CIBER-CB06/01/0040)-Spain, Fondo Investigación Sanitaria-PI 08/2028 Ministerio Ciencia en Innovación PLE2009-0144, with participation of funds from FEDER (European Community). Ignacio Rego was supported by Contrato de Apoyo a la Investigación-Fondo Investigación Sanitaria (CA10/01564).

Author details

¹Osteoarticular and Aging Research Lab, Rheumatology Division, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Spain. ²Epidemiology Unit, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, Spain. ³CIBER-BBN, ISCIII, Spain.

Authors' contributions

MF carried out the experimental procedures of the mitochondrial haplogroups identification. She helped to draft the manuscript and he has given final approval of the version to be published. ASH carried out the quantification of SOD-2 and catalase by ELISA. SP performed the statistical analysis and helped to draft the manuscript. NO and CFL collected the samples and checked clinical histories for the inclusion and exclusion criteria. IRP has been involved in the conception and design of the study, he helped to draft the manuscript and he has given final approval of the version to be published. He was also involved in the mitochondrial haplogroups identification. FJB conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 2 June 2011 Accepted: 22 November 2011

Published: 22 November 2011

References

1. Felson DT, Zhang Y: An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998, **41**(8):1343-1355.
2. Garnero P, Piperno M, Gineyts E, Christgau S, Delmas PD, Vignon E: Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis* 2001, **60**(6):619-626.
3. Garnero P, Ayral X, Rousseau JC, Christgau S, Sandell LJ, Dougados M, Delmas PD: **Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(10):2613-2624.
4. Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Ensig M, Gineyts E, Rosenquist C, Qvist P: **Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation.** *Bone* 2001, **29**(3):209-215.
5. Schett G, Zwerina J, Axmann R, Willeit J, Stefan K: **Risk prediction for severe osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**:1573-1574.
6. Qvist P, Christiansen C, Karsdal MA, Madsen SH, Sondergaard BC, Bay-Jensen AC: **Application of biochemical markers in development of drugs for treatment of osteoarthritis.** *Biomarkers* 2010, **15**(1):1-19.
7. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Diaz M, Urriés A, Montoro L, López-Pérez MJ, et al: **Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility.** *Am J Hum Genet* 2000, **67**(3):682-696.
8. van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, Welsh-Bohmer KA, Saunders AM, Roses AD, Small GW, et al: **Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk.** *Neurosci Lett* 2004, **365**(1):28-32.
9. Lakatos A, Derbeneva O, Younes D, Keator D, Balken T, Lvova M, Brandon M, Guffanti G, Reglodi D, Saykin A, et al: **Association between mitochondrial DNA variations and Alzheimer's disease in the ADNI cohort.** *Neurobiol Aging* 2010, **31**(8):1355-1363.
10. Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylha M, Majamaa K: **Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population.** *Hum Genet* 2003, **112**(1):29-33.
11. Dominguez-Garrido E, Martínez-Redondo D, Martín-Ruiz C, Gómez-Durán A, Ruiz-Pesini E, Madero P, Tamarillas M, Montoya J, von Zglinicki T, Díez-Sánchez C, et al: **Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations.** *Biogerontology* 2009, **10**(4):435-442.
12. Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Lopez C, Arenas J, Blanco FJ: **Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(8):2387-2396.
13. Rego I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Gómez-Reino JJ, González A, Arenas J, Blanco FJ: **Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(1):210-213.
14. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Deberg M, Perteiga S, Fernández-López C, Oreiro N, Henrotin Y, Blanco FJ: **Mitochondrial DNA haplogroups modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(5):910-917.
15. Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Deberg M, Perteiga S, Fernandez-Lopez C, Oreiro N, Henrotin Y, Blanco FJ: **Mitochondrial DNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis England* 2011, **70**:646-652.
16. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E: **Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups.** *Hum Mol Genet* 2010, **19**(17):3343-3353.
17. Martínez-Redondo D, Marcuello A, Casajús JA, Ara I, Dahmani Y, Montoya J, Ruiz-Pesini E, López-Pérez MJ, Díez-Sánchez C: **Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO2max consumer-is it a paradox?** *Mitochondrion* 2010, **10**(2):102-107.
18. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T: **Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?** *Osteoarthritis Cartilage, England* 2005, **13**:643-654.
19. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP: **The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage, England* 2003, **11**:747-755.
20. Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K: **Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function.** *Arthritis Res Ther* 2005, **7**(2):R380-391.
21. Cillero-Pastor B, Carames B, Lires-Dean M, Vaarmonde-García C, Blanco FJ, Lopez-Armeda MJ: **Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(8):2409-2419.

22. Petersen SV, Oury TD, Ostergaard L, Valnickova Z, Wegrzyn J, Thogersen IB, Jacobsen C, Bowler RP, Fattman CL, Crapo JD, et al: **Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation.** *J Biol Chem, United States* 2004, **279**:13705-13710.
23. Henriotin Y, Kurz B: **Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality?** *Curr Drug Targets* 2007, **8**(2):347-357.
24. Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW: **Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(1):107-113.
25. Regan E, Flannelly J, Bowler R, Tran K, Nicks M, Carbone BD, Glueck D, Heijnen H, Mason R, Crapo J: **Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**(11):3479-3491.
26. Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R, Bartnik E: **Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(11):3533-3544.
27. Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martinez-Gomariz M, Fernandez M, Blanco FJ: **Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance.** *Mol Cell Proteomics* 2009, **8**(1):172-189.
28. Olszewska-Slonina DM, Matewski D, Drewa G, Wozniak A, Czajkowski R, Rajewski P, Olszewski KJ, Zegarska B: **Oxidative equilibrium in the prophylaxis of degenerative joint changes: an analysis of pre- and postoperative activity of antioxidant enzymes in patients with hip and knee osteoarthritis.** *Med Sci Monit, Poland* 2010, **16**:CR238-245.
29. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al: **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**(8):1039-1049.
30. Kellgren JH, Lawrence JS: **Radiological assessment of osteo-arthrosis.** *Ann Rheum Dis* 1957, **16**(4):494-502.
31. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC: **Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations.** *Genetics* 1996, **144**(4):1835-1850.
32. Mathy-Hartert M, Hogge L, Sanchez C, Deby-Dupont G, Crielaard JM, Henriotin Y: **Interleukin-1beta and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation.** *Osteoarthritis Cartilage, England* 2008, **16**:756-763.
33. Wallace DC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D: **mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2003, **68**:479-486.
34. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC: **Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA.** *Science* 2004, **303**(5655):223-226.
35. Scott JL, Gabriellides C, Davidson RK, Swingle TE, Clark IM, Wallis GA, Boot-Handford RP, Kirkwood TB, Taylor RW, Young DA: **Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease.** *Ann Rheum Dis, England* 2010, **69**:1502-1510.
36. Pinto S, Rao AV, Rao A: **Lipid peroxidation erythrocyte antioxidants and plasma antioxidants in osteoarthritis before and after homeopathic treatment.** *Homeopathy, Scotland* 2008, **97**:185-189.
37. Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, Yan T, Domann FE, St. Clair DK: **Inhibition of cell growth and sensitization to oxidative damage by overexpression of manganese superoxide dismutase in rat glioma cells.** *Cell Growth Differ* 1996, **7**(9):1175-1186.
38. Bauer DC, Hunter DJ, Abramson SB, Attur M, Corr M, Felson D, Heinegård D, Jordan JM, Kepler TB, Lane NE, et al: **Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**(8):723-727.
39. van Spil WE, DeGroot J, Lems WF, Ostveen JC, Lafeber FP: **Serum and urinary biochemical markers for knee and hip-osteoarthritis: a systematic review applying the consensus BIPED criteria.** *Osteoarthritis Cartilage* 2010, **18**(5):605-612.
40. Andersson ML, Thorstenson CA, Roos EM, Petersson IF, Heinegård D, Saxne T: **Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP)**

- increase temporarily after physical exercise in patients with knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2006, **7**:98.
41. Kong SY, Stabler TV, Criscione LG, Elliott AL, Jordan JM, Kraus VB: **Diurnal variation of serum and urine biomarkers in patients with radiographic knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(8):2496-2504.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
http://www.biomedcentral.com/1471-2474/12/264/prepub

doi:10.1186/1471-2474-12-264

Cite this article as: Fernandez-Moreno et al.: **Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and serum levels of anti-oxidant enzymes in patients with osteoarthritis.** *BMC Musculoskeletal Disorders* 2011 **12**:264.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

Open Access

mtDNA haplogroup J Modulates telomere length and Nitric Oxide production

Mercedes Fernández-Moreno¹, María Tamayo², Angel Soto-Hermida¹, Alejandro Mosquera², Natividad Oreiro¹, Carlos Fernández-López¹, José Luis Fernández², Ignacio Rego-Pérez¹ and Francisco J Blanco^{1,3,4*}

Abstract

Background: Oxidative stress due to the overproduction of nitric oxide (NO) and other oxygen reactive species (ROS), play a main role in the initiation and progression of the OA disease and leads to the degeneration of mitochondria. Therefore, the goal of this work is to describe the difference in telomere length of peripheral blood leukocytes (PBLs) and Nitric Oxide (NO) production between mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroup J and non-J carriers, as indirect approaches of oxidative stress.

Methods: The telomere length of PBL was analyzed in DNA samples from 166 healthy controls (114 J and 52 non-J) and 79 OA patients (41 J and 38 non-J) by means of a validated qPCR method. The NO production was assessed in 7 carriers of the haplogroup J and 27 non-J carriers, by means of the colorimetric reaction of the Griess reagent in supernatants of cultured chondrocytes. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA from these samples was analyzed by qPCR. Appropriated statistical analyses were performed

Results: Carriers of the haplogroup J showed a significantly longer telomere length of PBLs than non-J carriers, regardless of age, gender and diagnosis ($p = 0.025$). Cultured chondrocytes carrying the mtDNA haplogroup J also showed a lower NO production than non-J carriers ($p = 0.043$). No significant correlations between age and telomere length of PBLs were detected neither for carriers of the haplogroup J nor for non-J carriers. A strong positive correlation between NO production and iNOS expression was also observed (correlation coefficient = 0.791, $p < 0.001$).

Conclusion: The protective effect of the mtDNA haplogroup J in the OA disease arise from a lower oxidative stress in carriers of this haplogroup, since this haplogroup is related to lower NO production and hence longer telomere length of PBLs too.

Keywords: mitochondria, osteoarthritis, cartilage, arthritis, nitric oxide, telomere

Background

Osteoarthritis (OA), the most common form of joint disease and cause of musculoskeletal disability in elderly people, is a disease affecting articular cartilage, bone and soft tissue leading to joint destruction and severe impairment of mobility [1]. It is also the main cause of work incapacity and one of the most common reasons for visiting primary physicians. The metabolic and structural changes that take place in the articular cartilage, including the reactive oxygen and nitrogen species (RONS), are

thought to play a main role in the initiation and progression of this disease.

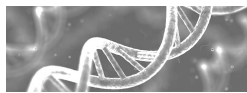
A growing body of evidence suggests that oxidative damage, due to the overproduction of nitric oxide (NO) and other reactive oxygen species (ROS), may be involved in the pathogenesis of OA [2,3]. The increased levels of these ROS have been correlated to increased levels of inflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1), which is implicated in the degeneration of cartilage due to its induction of proteoglycan loss and matrix degradation [4]. Both IL-1 and mechanical loading of cartilage increase the production of NO by upregulating the nitric oxide synthase 2 [5]; and most of the destructive effects of NO in articular cartilage are related to the ability of

* Correspondence: fblagar@sergas.es

¹INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC).

Rheumatology Division, As Xubias 84, 15006-A Coruña, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



NO to combine with superoxide anions (O_2^-) to generate peroxynitrite (ONOO⁻) [6,7].

RONS can have multiple effects on chondrocytes, but are associated with oxidative damage to DNA, proteins and lipids, resulting in a loss of extracellular matrix and cell death [2,8,9]. However, the most direct effect of NO is the inhibition of adenosine triphosphate (ATP) production, by competing with oxygen to bind to cytochrome oxidase on the mitochondria, thereby inhibiting the electron transport chain and the generation of ATP [10,11]. This latter aspect would strengthen the role of the mitochondria in the OA disease, as previously described [6,12-15].

The mtDNA haplogroups have been associated not only with several multifactorial diseases [16-18] and ageing [19,20], but also with OA; people carrying the mtDNA haplogroup J show lower prevalence and severity of knee and hip OA [14,21]. Besides, they modulate the serum levels of some collagen type-II molecular biomarkers [22] as well as some proteolytic enzymes, such as metalloproteinases [23]. The proposed mechanism relies on the different metabolic characteristics of these haplogroups, reflected by the performance of the mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) of each haplogroup [16,24], as well as the lower oxygen consumption and lower oxidative damage in carriers of the mtDNA haplogroup J [25].

Telomeres are capping structures at chromosome ends that prevent the recognition of natural chromosome ends as DNA double strand breaks. After several cell doublings, excessive telomere shortening triggers a checkpoint, leading to apoptosis. However, it has also been reported that oxygen free radicals (O_2^- and ONOO⁻) directly injure the guanine repeats in the telomere DNA, indicating that oxidative stress directly leads to telomere erosion, regardless of cell division [26,27].

Taking into account that mtDNA haplogroup J is less prone to suffer oxidative stress than the rest of mitochondrial haplogroups, as previously proposed [24,28,29], the aim of this study was to evaluate if this mtDNA haplogroup is correlated with both the telomere length of peripheral blood leukocytes (PBL) and the NO production, two oxidative stress-related features. In order to demonstrate this, we measured the telomere length of peripheral blood leukocytes (PBLs) in a large cohort of samples (OA patients and healthy controls), and assessed the NO production and inducible Nitric oxide synthase (iNOS) expression in cultured chondrocytes.

Methods

Samples obtention

For telomere length, DNA from healthy (hip OA-free) control population ($n = 115$; mean age = 43.13 ± 12.47 years; range: 19-68) was provided by Banco Nacional de

ADN (University of Salamanca, Spain), and also by Hospital Universitario A Coruña ($n = 79$ OA patients; mean age = 69.46 ± 8.97 years; range: 42-95) and ($n = 51$ healthy controls; mean age = 71 ± 14.48 ; range: 42-93). Total of 166 healthy controls (89 females and 77 males), 114 had the haplogroup J and 52 were non-J carriers; of the 79 OA patients (54 females and 25 males), 41 had the haplogroup J and 38 were non-J carriers. Those healthy controls from Banco Nacional de ADN consisted of a population sample on which only those individuals who did not suffer from symptomatic hip OA neither had been diagnosed of hip OA at the moment of the study were selected. The cohort from A Coruña include hip OA patients with different radiographic K-L grades, and controls free of hip OA as assessed by anamnesis, a clinical examination and radiographic studies.

For NO production and iNOS expression, the cartilage samples were also obtained from Hospital Universitario A Coruña: OA cartilage was obtained from the femoral heads of 24 OA patients (12 females and 12 males) who underwent joint replacement surgery (mean age = 73.61 ± 8.39 years; range: 57-90), and normal human cartilage was obtained from autopsy from 10 cadavers (6 females and 4 males) who had no history of joint disease and who had macroscopically normal cartilage, as well as from patients who suffered hip fracture and underwent hip replacement surgery (mean age = 63.90 ± 14.26 years; range: 45-83). Of the 24 OA patients, 4 have the haplogroup J and 20 are non-J carriers; of the 10 healthy controls, 3 have the haplogroup J and 7 are non-J carriers. Informed consent was obtained from all participants, and this study was approved by ethics committee of Galicia (reference number 2008/141).

DNA isolation

DNA from samples obtained in our facilities was extracted using the Magtraction System12CG (Precision System Science Co., Ltd., Matsudo, Chiba, Japan) using Magtraction-MagaZorb DNA Common Kit-200 N reagents, and then quantified using the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). Coded DNA samples were processed by personnel blinded to the status of the subjects. The isolated DNA was used to perform both the assignment of the mtDNA haplogroups and the telomere quantification.

Assignment of mtDNA haplogroups

The samples obtained for the present study were haplogroup-typed using a previously described assay [14].

Telomere quantification

The average telomere length of PBL was measured with a validated quantitative (Q-PCR)-based assay using a LightCycler 480 thermalcycler (Roche Diagnostics®,

Laval, Quebec, Canada) in a 96-well format, as described in Tamayo *et al* [30]. This method measures the average ratio of telomere repeat copy number to a single gene (36B4) copy number (T/S ratio) in each sample.

Chondrocytes culture and NO production

The chondrocytes culture was performed as described in Maneiro *et al* [12]. Briefly, the dissected cartilage was incubated at 37°C with trypsin for 10 minutes. After removing trypsin solution, the cartilage slices were treated with type IV collagenase (2 mg/mL; SIGMA, St. Louis, MO) for 12-16 hours. Human chondrocytes were recovered and plated in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life technologies, Paisley, UK) supplemented with 100 units/ml penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS) (Life technologies). Chondrocytes were incubated at 37°C in a humidified gas mixture containing 5% CO₂.

When human chondrocytes reached the confluency, a total of 5×10^4 cells were collected by trypsinization and plated in 96-well plates with Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 100 units/ml penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10% FBS for 24 hours. In order to measure the NO production, the FBS of the medium was changed to a concentration of 0,5% for 48 hours, after which the assessment of the NO production was carried out. The measure was performed by an indirect method in supernatants of each sample by duplicate by means of the colorimetric reaction of the Griess reagent (Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, USA), using a standard curve with NaNO₂. The absorbencies emitted were captured in a spectrophotometer (*Labsystems Multiskan[®] Plus*).

iNOS expression

RNA was isolated from the above cultured cells (5×10^5) following the Trizol (Invitrogen[®], Life Technologies, Paisley, UK)-based method. Isolated and DNase-treated RNA (1000 ng) was retrotranscribed to cDNA using the Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit from Roche Diagnostics[®] following the manufacturer's recommendations.

The real-time PCR was performed using a LightCycler 480 thermalcycler in a 96-well format. Duplicate cDNA samples were amplified in parallel in a final volume of 20 µL, that included 5 µL cDNA, 10 µL of LightCycler[®] 480 Sybr Green I Master (Roche Diagnostics[®]), 0.25 µL Uracil-DNA glycosylase (UDG) to prevent carry-over contaminations (Roche Diagnostics) and 0.3 µM of specific primers for iNOS (forward: 5'-gctgccaagctgaaattga-3'; reverse: 5'-gatagcgtctgctcttg-3') and the reference gene HPRT (forward: 5'-tgacctgattatttgcatacc-3'; reverse: 5'-cgagcaagactgttcactct-3'). After two previous steps of 40°C for 10 minutes, to activate the UDG, and

95°C for 10 minutes to activate the Taq polymerase, the mixture was amplified as follows: 55 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 melting point curve analysis using one cycle at 95°C for 5 seconds and 65°C for 1 minute followed by a heating up step to 97°C in a continuous way of fluorescence acquisition.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS software, release 17 (Chicago, USA) and Relative Expression Software Tool (REST), release 1.9.9 [31]. A non-parametric study was performed, utilizing the Mann-Whitney *U*-test, to compare the telomere length of PBL between OA patients and healthy controls, as well as between haplogroup J carriers and non-J carriers. The same statistical approach was used to compare the NO production and iNOS expression between haplogroup J and non-J carriers.

Following the above approach, an analysis of covariance (ANCOVA) was used to evaluate the effects of haplogroup J on telomere length, adjusting for the confounder effects of diagnosis, gender and covariate age. ANCOVA assumptions were tested in each case and no violations were found. Before the multivariate analysis, a distribution analysis using the Kolmogorov-Smirnov test showed that the telomere length data were normally distributed. Additionally, we also performed a Spearman's correlation test and subsequent scatterplots to analyze possible correlations between age and telomere length in both J and non-J carriers.

Finally, the data from the real time PCR experiments were analyzed using REST software, which uses bootstrap randomization techniques to determine whether an observed up or down-regulation in samples is significant after normalization to housekeepers. To test the correlation between the iNOS expression and the NO production, a Spearman's correlation analysis was performed.

Results

Telomere length

The non-parametric analysis of the telomere length of PBL between OA patients and healthy controls showed that OA patients had a shorter telomere length than healthy controls (0.986 vs 1.008 respectively), however this difference did not reach the statistical significance between both groups (Table 1). Interestingly, the mean telomere length for all the mtDNA haplogroups showed that carriers of the haplogroup J had a significantly longer length than non-J carriers (1.039 vs 0.933 respectively) ($p = 0.003$) (Table 1).

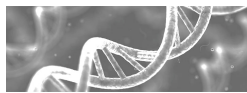


Table 1 Mean telomere length in OA patients and healthy controls and in carriers of the mtDNA haplogroup J

	n	Mean age ± SD	T/S ratio ± SD	p*
OA patients	79	69.46 ± 8.97	0.986 ± 0.261	0.684
Healthy controls	166	51.92 ± 18.45	1.008 ± 0.287	
Haplogroup J	155	52.97 ± 17.60	1.039 ± 0.287	0.003**
Non-J	90	65.22 ± 15.98	0.933 ± 0.254	

(*) Mann-Whitney non-parametric U-test

(**) indicates statistical significance ($p \leq 0.05$)

SD = Standard deviation

We then performed a multiple regression analysis to assess the effects of the mtDNA haplogroup J and other variables such as diagnosis, gender and age on the telomere length of PBL. The results obtained also reflected that carriers of the mtDNA haplogroup J showed a significantly longer telomere length than non-J carriers ($p = 0.025$) (Figure 1). The rest of variables tested such as age, gender and diagnosis did not show any influence on the telomere length of PBLs.

Despite age was not associated with telomere length in this study, we also performed a Spearman's correlation test and subsequent scatterplots for both J and non-J carriers. The results obtained did not show correlation between age and telomere length of PBLs neither in carriers of the haplogroup J neither in non-J carriers, strengthening the results obtained in the multiple regression analysis (Figure 2a and 2b).

NO production and iNOS expression

The results obtained showed that mean NO production was significantly lower in haplogroup J carriers when

compared with non-J carriers (17.75 vs 47.30 respectively; $p = 0.043$) (Figure 3). The expression of iNOS in carriers of haplogroup J was (not significantly) lower than in non-J carriers (Figure 4). In addition, a strong positive correlation between the NO production and the expression of iNOS was also demonstrated (correlation coefficient 0.791, p -value < 0.001) (Figure 5).

Discussion

To our knowledge, this is the first study to correlate the telomere length with the mtDNA haplogroups, showing that carriers of the mtDNA haplogroup J have a longer telomere length of PBLs than non-J carriers. The results obtained also showed that cultured chondrocytes that carry the mtDNA haplogroup J show lower NO production and lower levels of iNOS than non-J carriers.

There are several studies that analyzed the telomerase activity in OA that showed that the presence of oxidative stress induces telomere genomic instability, replicative senescence and dysfunction of chondrocytes in OA cartilage [27]. On the contrary, other study proposes that the role of telomerase in the OA pathogenesis is still uncertain [32]. A recent work reported that telomere length of PBLs seemed not to be influenced by local OA pathology, confirming our present results; nevertheless, other rheumatologic diseases with higher and systemic inflammatory component, such as rheumatoid arthritis (RA), psoriatic arthritis (PA) and ankylosing spondylitis (AS) affected telomere length of PBLs, so that these patients showed longer telomere length than healthy controls [30]. However, the telomere length in OA chondrocytes is significantly shorter than in healthy aged chondrocytes, which may imply a local advance senescence that could contribute to the pathogenesis or progression of the OA disease [33].

It has been previously described that oxidative stress leads to telomere erosion, regardless of cell division, and that IL-1, one of the main pro-inflammatory cytokines involved in the OA process, stimulates NO production leading to the formation of ONOO[•], which targets guanine repeats in DNA telomeres [26,27,34]. NO has been previously described to be increased in OA chondrocytes [35-37], and our results confirmed these findings (data not shown). In this sense, a work carried out by our group showed that carriers of the mtDNA haplogroup J have lower serum levels of Coll2-1NO₂ than carriers of the haplogroup H [22] and, because the effect of NO on chondrocyte survival has been shown to be mediated by its effect on the mitochondrial respiratory chain [11], and Coll2-1NO₂ is an indicator of oxidative stress status of the chondrocyte [38], these findings suggest that chondrocytes carrying the haplogroup J may have less oxidative stress. This latter conclusion is strengthened in the present study, since those carriers of the mtDNA

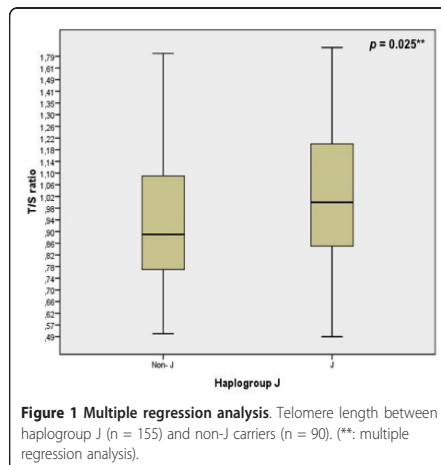
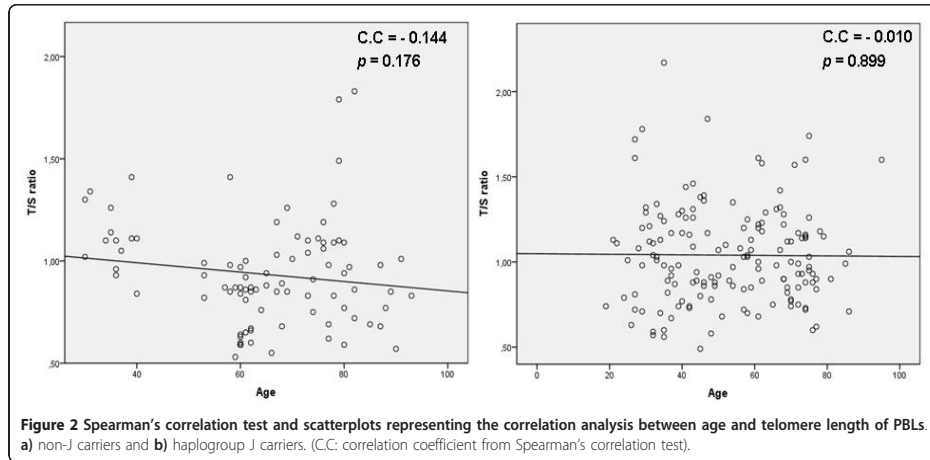


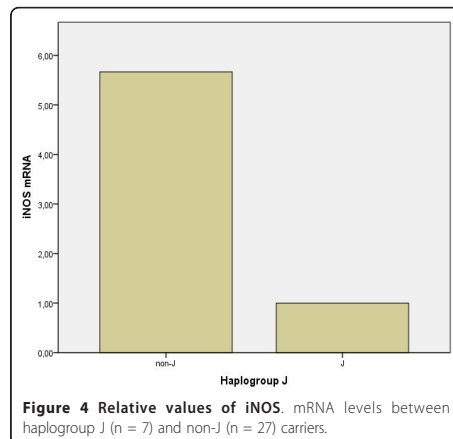
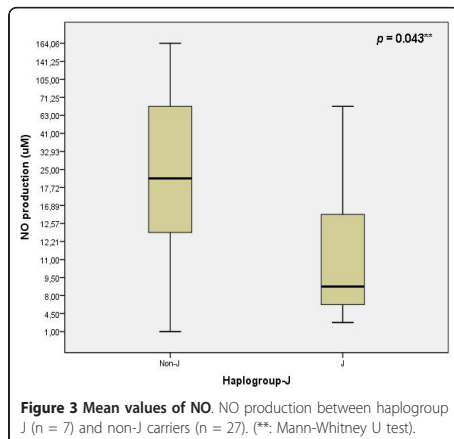
Figure 1 Multiple regression analysis. Telomere length between haplogroup J (n = 155) and non-J carriers (n = 90). (**: multiple regression analysis).

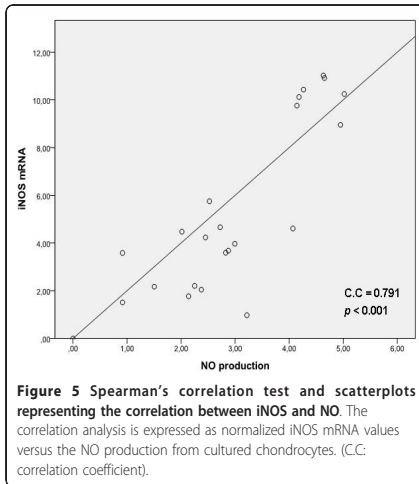
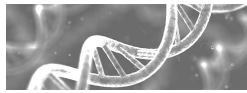


haplogroup J show not only longer telomere length of PBLs, but also lower NO production and lower iNOS expression in cultured chondrocytes. However, we must point out that the telomere length was measured in PBLs and the NO production in cultured chondrocytes, therefore a direct correlation cannot be determined, but it is possible to speculate it since both cell types have in common the haplogroup J.

The proposed explanation would rely on the reduced coupling efficiency of the OXPHOS system of the mtDNA haplogroup J. This would reduce maximal ATP production and keep the mitochondrial electron transport chain more oxidized, thereby reducing ROS production and apoptosis [29]. With this scenario, the lower the

O₂⁻ generated, the lower the ONOO⁻ produced, resulting in a decreased oxidative damage by RONS and, consequently, the longer the telomere length. Besides, it is well known that mitochondria is involved in the NO production through the reduction of nitrite by cytochrome c oxidase, and regulated by oxygen on multiple levels [39,40]; since mtDNA haplogroup J show a lower oxygen consumption [25], we speculate that this could be one of the reasons why carriers of this haplogroup show lower NO production and hence longer telomere length, indicating a decreased oxidative damage. Because of this, the mtDNA haplogroup J not only protects from the development of both knee and hip OA [14,21], but has also





been associated with increased longevity in different independent studies [19,20,41,42].

Despite the strong statistical correlation between the iNOS mRNA expression and the NO production, a higher variability in the results was detected. This could be due to i) the existence of different phenotypes of the OA disease and, among the possible causes to explain this, the mtDNA haplogroups could be one of them; or ii) the small sample size regarding to haplogroup J carriers. On the contrary, this variability was not detected when analyzed the telomere length of PBL, and a consistent statistical association between the mtDNA haplogroup J and the telomere length was detected, clearly indicating that cells carrying this haplogroup suffer less oxidative stress. However, no differences in the telomere length of PBLs were detected between OA patients and healthy controls, as described earlier [30].

Conclusion

In summary, this study shows that carriers of the mtDNA haplogroup J show a significantly higher telomere length of PBL than non-J carriers, as well as a decreased NO production and lower iNOS mRNA levels in cultured chondrocytes, indicating that this haplogroup, which is clearly biochemically different from those of other population-specific mtDNA lineages [43], is associated with reduced oxidative stress. However, since these two features were analyzed in two different cell types, a correlation between the lower NO production and the longer telomere length cannot be directly determined but it is possible to speculate it because both cell types have in common the haplogroup J.

Abbreviations

mtDNA: Mitochondrial deoxyribonucleic acid; PBL: Peripheral blood leukocytes; NO: Nitric oxide; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; ANCOVA: Analysis of covariance; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; REST: Relative expression software tool; OA: Osteoarthritis; RONS: Reactive oxygen and nitrogen species; ROS: Reactive oxygen species; IL-1: Interleukin-1; O₂⁻: Ion superoxide; ONOO⁻: Peroxynitrite; DNA: deoxyribonucleic acid; ATP: Adenosine triphosphate; OX-HFOS: Oxidative phosphorylation system; FBS: Fetal bovine serum; cDNA: complementary deoxyribonucleic acid; UDG: Uracil-DNA glycosylase; RA: Rheumatoid arthritis; PA: Psoriatic arthritis; AS: Ankylosing Spondylitis; Coll2-1NO₂: Nitrate form of the denaturation epitope of the triple helical domain of the collagen type II; SPSS: Statistical package for the social sciences.

Acknowledgements

We are grateful to Banco Nacional de ADN (University of Salamanca, Spain) for providing control OA-free DNA samples. This study was supported by grants from Fundación Española de Reumatología (programa GEN-SER) and from Fondo Investigación Sanitaria (CIBER-CB06/01/0040)-Spain, Fondo Investigación Sanitaria-PI 08/2028 and PI 07/0459; Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, with participation of funds from FEDER (European Community). Jose L. Fernandez-Garcia was supported by Miguel Servet program from ISCIII-Spain and Ignacio Rego was supported by Contrato de Apoyo a la Investigación-Fondo Investigación Sanitaria (CA10/01564).

Author details

¹INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAQ), Rheumatology Division, As Xubias 84, 15006-A Coruña, Spain. ²INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAQ), Genetics Unit, As Xubias 84, 15006-A Coruña, Spain. ³Proteo-Red/ISCIII, Madrid, Spain. ⁴CIBER-BBN-ISCIII, Madrid, Spain.

Authors' contributions

MFM carried out the experimental procedures of the mitochondrial haplogroups identification. She performed the statistical analysis and helped to draft the manuscript. MT and AM performed telomere quantification experiments. ASH carried out DNA isolation, quantification of Nitric Oxide production and iNOS expression. NO and CFL helped in collecting of samples and data clinic. JLF participated in study design and interpretation of data. IR was involved in the assignment of mtDNA haplogroups and analysed the data. He also participated in study design, interpretation of data and drafted the manuscript. FJB conceived and coordinated the project and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 8 August 2011 Accepted: 15 December 2011

Published: 15 December 2011

References

1. Felson DT, Zhang Y: An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998, **41**(8):1343-1355.
2. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995, **146**(1):75-85.
3. Henrotin Y, Kurz B: Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality? *Curr Drug Targets* 2007, **8**(2):347-357.
4. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, Feige U, Poole AR: Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2005, **52**(1):128-135.
5. Agarwal S, Deschner J, Long P, Verma A, Hofman C, Evans CH, Piesco N: Role of NF-kappaB transcription factors in antiinflammatory and proinflammatory actions of mechanical signals. *Arthritis Rheum* 2004, **50**(11):3541-3548.
6. Terkeltaub R, Johnson K, Murphy A, Ghosh S: Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion* 2002, **1**(4):301-319.
7. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007, **87**(1):315-424.

8. Kühn K, Shikhman AR, Lotz M: Role of nitric oxide, reactive oxygen species, and p38 MAP kinase in the regulation of human chondrocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 2003, **197**(3):379-387.
9. Davies CM, Guilak F, Weinberg JB, Fermor B: Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, **16**(5):624-630.
10. Stefanovic-Racic M, Stadler J, Georgescu HJ, Evans CH: Nitric oxide and energy production in articular chondrocytes. *J Cell Physiol* 1994, **159**(2):274-280.
11. Maneiro E, López-Armada MJ, de Andres MC, Caramés B, Martín MA, Bonilla A, Del Hoyo P, Galdo F, Arenas J, Blanco FJ: Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(3):388-395.
12. Maneiro E, Martín MA, de Andres MC, López-Armada MJ, Fernández-Sueiro JL, del Hoyo P, Galdo F, Arenas J, Blanco FJ: Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003, **48**(3):700-708.
13. Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW: Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, **17**(11):107-113.
14. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Arenas J, Blanco FJ: Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008, **58**(8):2387-2396.
15. Blanco FJ, Rego-Pérez I, Ruiz-Romero C: The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nature reviews* 2011.
16. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Díaz M, Urríes A, Montoro L, López-Pérez MJ, et al: Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 2000, **67**(3):682-696.
17. van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, Welsh-Bohmer KA, Saunders AM, Roses AD, Small GW, et al: Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett* 2004, **365**(1):28-32.
18. Lakatos A, Derbeneva O, Younes D, Keator D, Bakken T, Lvova M, Brandon M, Guffanti G, Reglodi D, Saykin A, et al: Association between mitochondrial DNA variations and Alzheimer's disease in the ADNI cohort. *Neurobiol Aging* 2010, **31**(8):1355-1363.
19. Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylha M, Majamaa K: Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet* 2003, **112**(1):29-33.
20. Dominguez-Garrido E, Martínez-Redondo D, Martín-Ruiz C, Gómez-Durán A, Ruiz-Pesini E, Madero P, Tamparrillas M, Montoya J, von Zglinicki T, Díez-Sánchez C, et al: Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations. *Biogerontology* 2009, **10**(4):435-442.
21. Rego I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Gómez-Reino JJ, González A, Arenas J, Blanco FJ: Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(11):210-213.
22. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Deberg M, Pérttega S, Fernández-López C, Oreiro N, Henrotin Y, Blanco FJ: Mitochondrial DNA haplogroups modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(5):910-917.
23. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Deberg M, Pérttega S, Fernández-López C, Oreiro N, Henrotin Y, Blanco FJ: mtDNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2011, **70**(4):646-652.
24. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E: Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 2010, **19**(17):3343-3353.
25. Martínez-Redondo D, Marcuello A, Casajús JA, Ara I, Dahmani Y, Montoya J, Ruiz-Pesini E, López-Pérez MJ, Díez-Sánchez C: Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO2max consumer—is it a paradox? *Mitochondrion* 2010, **10**(2):102-107.
26. Yermilov V, Rubio J, Ohshima H: Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett* 1995, **376**(3):207-210.
27. Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K: Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 2005, **7**(2):R380-391.
28. Wallace DC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D: mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2003, **68**:479-486.
29. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC: Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 2004, **303**(5655):223-226.
30. Tamayo M, Mosquera A, Rego JI, Fernández-Sueiro JL, Blanco FJ, Fernández JL: Differing patterns of peripheral blood leukocyte telomere length in rheumatologic diseases. *Mutat Res* 2010, **683**(1-2):68-73.
31. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L: Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(9):e36.
32. Martin JA, Klingelutz AJ, Mousavi-Harami F, Buckwalter JA: Effects of oxidative damage and telomerase activity on human articular cartilage chondrocyte senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2004, **59**(4):324-337.
33. Tamayo M, Mosquera A, Rego I, Blanco FJ, Gosálvez J, Fernández JL: Decreased length of telomeric DNA sequences and increased numerical chromosome aberrations in human osteoarthritic chondrocytes. *Mutat Res* 2011, **708**:50-8.
34. Mosquera A, Gosálvez J, Sabatier L, Fernández JL: Interstitial telomeric DNA sequences of Chinese hamster cells are hypersensitive to nitric oxide damage, and DNA-PKcs has a specific local role in its repair. *Genes Chromosomes Cancer* 2005, **44**(1):76-84.
35. Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, Stuchin SA, Abramson SB: The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995, **182**(6):2097-2102.
36. Melchiorri C, Melliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, Borzi RM, Uguccioni M, Facchini A: Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998, **41**(12):2165-2174.
37. Abramson SB, Attur M, Yazici Y: Prospects for disease modification in osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006, **2**(6):304-312.
38. Deberg M, Dubuc JE, Labasse A, Sanchez C, Quettier E, Bosseloir A, Crielaard JM, Henrotin Y: One-year follow-up of Col2-1, Col2-1NO2 and myeloperoxidase serum levels in osteoarthritis patients after hip or knee replacement. *Ann Rheum Dis* 2008, **67**(2):168-174.
39. Reutov VP, Sorokina EG: NO-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. *Biochemistry (Moscow)* 1998, **63**(7):874-884.
40. Shiva S: Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide* 2010, **22**(2):64-74.
41. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, Bonafe M, Monti D, Baggio G, Bertolini S, et al: Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J* 1999, **13**(12):1532-1536.
42. Ross OA, McCormack R, Curran MD, Duguid RA, Barnett YA, Rea IM, Middleton D: Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population. *Exp Gerontol* 2001, **36**(7):1161-1178.
43. Wallace DC: Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999, **283**(5407):1482-1488.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
http://www.biomedcentral.com/1471-2474/12/283/prepub

doi:10.1186/1471-2474-12-283

Cite this article as: Fernández-Moreno et al.: mtDNA haplogroup J Modulates telomere length and Nitric Oxide production. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2011 **12**:283.

[Frontiers in Bioscience, Scholar, 5, 360-368, January 1, 2013]

Mitochondrial genetics and osteoarthritis

Ignacio Rego-Perez¹, Mercedes Fernandez-Moreno¹, Angel Soto-Hermida¹, Carlos Fenandez-Lopez¹, Natividad Oreiro¹, Francisco J. Blanco^{1,2,3}

¹Rheumatology Division, Genomic Laboratory INIBIC-Hospital Universitario A Coruna, As Xubias 84, 15006-A Coruna Spain, ²CIBER-BBN-Instituto de Salud Carlos III-Madrid-Spain, ³Departamento de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. The mtDNA haplogroups
 - 3.1. mtDNA haplogroups and osteoarthritis
 - 3.2. mtDNA haplogroups and OA-related biomarkers
 - 3.3. mtDNA haplogroups and OA-related features
 - 3.4. mtDNA haplogroups and longevity
 - 3.5. mtDNA haplogroups, Nitric Oxide (NO) and telomere damage
4. mtDNA damage and osteoarthritis
5. Conclusion
6. Acknowledgements
7. References

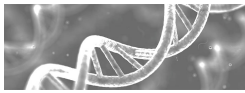
1. ABSTRACT

The genetic contribution is one of the most notable factors that play a main role in the risk of OA. Despite the genetics of this disease is complex and the finding of risk-related genes has been very challenging, evidence for genetic predisposition has been reported. Besides, in the last years recent evidences indicate that the mitochondrion is implicated in OA. In this context, the mtDNA haplogroups, defined as individual groups characterized by the presence of a particular set of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the mtDNA sequence, emerged as new genetic variants involved in this pathology. Moreover, it has been described that mtDNA damage not only accumulates in OA chondrocytes, but also that OA chondrocytes have limited mtDNA repair capacity. In this review we will focus on the influence of mitochondrial genetics and the mtDNA haplogroups in the prevalence, severity and progression of the OA disease, as well as their incidence on many OA-related features, such as serum levels of OA-related molecular markers, Nitric Oxide production or telomere length.

2. INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease related to aging and is characterized by late-onset degeneration of articular cartilage (1). OA is a disease that affects more than 10% of the population after the age of 45 years, and its prevalence increases up to 40% of people older than 70 years of age (2). Since the life expectancy in the developed world increases, it is estimated that the number of OA cases will double in the next three decades. OA is also the main cause of permanent work incapacitation and one of the most common reasons for visiting primary care physicians and, however, there is not fundamental treatment. Among the factors that play a role in the risk of OA, gender, age, body mass index (BMI) and genetic contribution are the most notable (1, 3). Moreover, evidences described in this review support the idea that mitochondrial genetics is also a key factor in the complex aetiology of OA.

The genetics of OA is complex, as it does not usually follows the typical pattern of mendelian inheritance



Mitochondrial genetics in osteoarthritis

and is probably associated with multiple gene interactions; however, evidence for genetic predisposition to this pathology was reported. Stecher and collaborators demonstrated that the presence of Heberden nodules in OA fingers of the hand were three times more likely to occur in twins compared to the general population (4). In addition, several classical twin studies have been performed in OA, concluding that the influence of the genetic factors is 60% in hip OA and 39% in knee OA (3). Even radiographic severity and OA progression seem to be influenced, at least in part, by genetics (5, 6). Nowadays, thanks to both recent advances of high-throughput single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping technology and the development of the HapMap project, it has been possible to test a large number of genetic markers across the genome by means of the Genome Wide Association Studies (GWAS). In the case of OA has proven very challenging to find risk-related genes, mainly due to i) the heterogeneity within clinical subsets of the disease and between different ethnic groups, ii) the influence of many loci each with a small effect and iii) the lack of analysis of rare large-effect mutations (3). However, interesting associations have been found, such as the rs143383 SNP in the growth differentiation factor 5 (GDF-5) gene with knee OA (7, 8).

Despite the glycolytic nature of articular chondrocytes, by which ATP production takes place mainly in the cytoplasm by the oxidative reactions of glycolysis, in the last years evidence indicates that the mitochondrion is implicated in OA (9). A significant decrease of complexes II and III of the mitochondrial respiratory chain (MRC) in OA chondrocytes has been described (10) and, in addition, the inhibition of complexes III and V of the MRC causes an increased inflammatory response potentially related to the production of reactive oxygen species (ROS) (11); besides, the apoptotic mitochondrial pathway is one of the major cellular pathways for apoptosis of OA chondrocytes (12) and even mitochondrial free radical production compromises chondrocyte function (13, 14) causing mitochondrial DNA (mtDNA) damage and reduced mtDNA capacity for repair (15, 16). In this context, the mtDNA haplogroups emerge as new genetic variants involved in the OA disease (17, 18). Briefly, these mitochondrial variants are defined as individual groups characterized by the presence of a particular set of SNPs, in the mtDNA sequence, that were accumulated sequentially along radiating maternal lineages (19). Among individuals of Caucasian ancestry, 95% of the population belongs to one of the following haplogroups: H, I, J, T, U, K, V, HV*, W or X. There is evidence about the importance of mtDNA haplogroups for energy production, in fact they show differences in their Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) coupling efficiency (20, 21) and, therefore, an increasing number of studies showing associations between some of the mtDNA haplogroups and multifactorial diseases have been carried out (22-24).

Taking into account this background, in this review we discuss some of the evidences implicating mitochondrial genetics in the risk of OA, as well as the causes of its involvement in degenerative diseases.

3. THE mtDNA HAPLOGROUPS

As stated above, the mtDNA haplogroups are related groups of mtDNAs characterized by stable polymorphic sites in mtDNA coding and non-coding regions (Figure 1a and 1b) (19) that were shaped by natural selection as humans migrated north into colder climates (Figure 1c) (20, 21). Specifically, European mtDNA haplogroups would also be expected to have been influenced by cold selection because of the episodic periods of cold associated with the repeated continental glaciations (Figure 1c) (25). Today, an increasing number of studies showing associations between the mtDNA haplogroups and different pathologies have been carried out, either as protective or risk factors. In this sense, one haplogroup may be linked to susceptibility to energy deficiency diseases, but also be protective for degenerative diseases and aging (21, 26). The explanation for this question is related to the multifunctional nature of the mitochondrion, whereby the OXPHOS system oxidizes the carbohydrates and fats of our diet with the oxygen we breathe to generate energy in the form of adenosine triphosphate (ATP) and heat to maintain our body temperature by means of a mechanism called coupling efficiency. Tightly coupled OXPHOS would produce maximum ATP and minimum heat, whereas partially uncoupled OXPHOS would generate more heat and less ATP. In this context, a mtDNA mutation that reduces the coupling efficiency of OXPHOS would diminish the ATP production, therefore increasing the susceptibility to energy deficiency diseases (i.e: LHON); on the contrary, the same mutation would keep the mitochondrial electron transport chain (ETC) more oxidized, thereby reducing reactive oxygen species (ROS) production and apoptosis, being protective for oxidative stress related diseases (i.e: Alzheimer, Parkinson, OA?) and increased longevity (Figure 2).

3.1. mtDNA haplogroups and OA

The involvement of mtDNA in the development of OA remained unclear until recently. A few reports analyzed the presence of mtDNA with 4977-base pair (bp) deletion in knee OA cartilage, concluding that the accumulation of this deletion increases with age and may play a role in the development of knee OA (27, 28). However, no study had shown a possible association between mtDNA polymorphisms and OA. Recent studies carried out by our group showed the relationship between the mtDNA haplogroups and OA. The first work demonstrated their role in the prevalence and severity of 457 knee OA patients from Spain, compared with 262 healthy controls, by which people carrying mtDNA haplogroup J may be at lower risk of developing knee OA (Odds Ratio (OR) 0.460; 95% Confidence Interval (CI) 0.282 – 0.748; $p=0.002$), and those carrying this haplogroup and suffered from OA present a lower radiological joint damage, attending to the Kellgren and Lawrence (K/L) score (OR 0.351; 95% CI 0.156 – 0.787; $p=0.012$) (17). These findings were replicated later in another study in which the authors analyzed 550 hip OA patients and 505 healthy controls from Spain, and showed that mtDNA haplogroup J was also associated with a lower risk of hip OA (OR 0.661; 95% CI 0.440 – 0.993; $p=0.045$)

Mitochondrial genetics in osteoarthritis

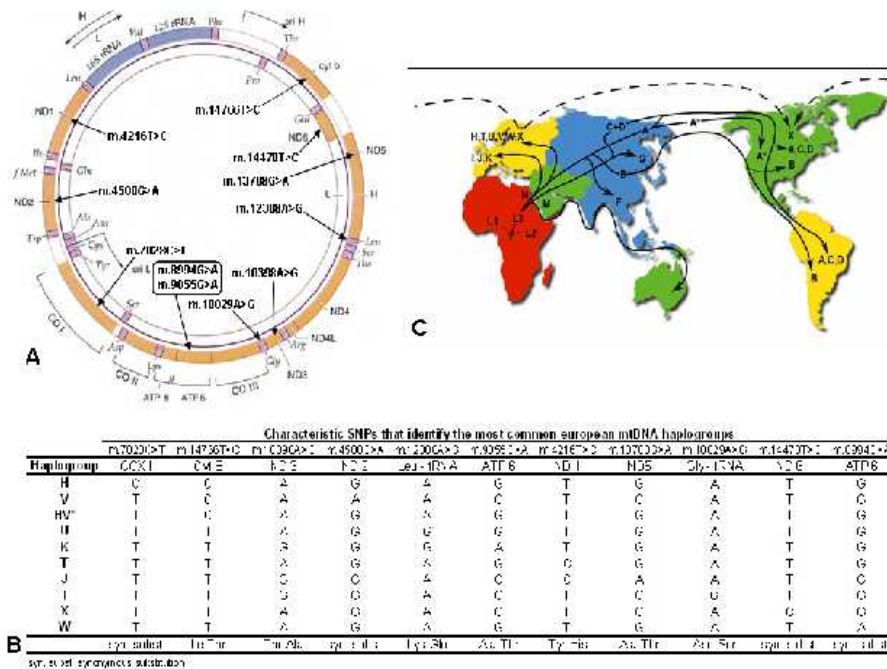


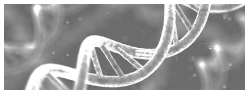
Figure 1. (A) Scheme of the human mtDNA molecule showing some of the characteristic polymorphisms (SNPs) that (B) identify the most common European mtDNA haplogroups. (C) mtDNA migrations, that permitted humans to adapt to different geoclimatic areas, gave rise to different mtDNA haplogroups. Reproduced with permission from Mitomap.

(18). In the same study, a cohort of patients with Rheumatoid Arthritis was also analyzed but no association between this pathology and the mtDNA haplogroups was detected, concluding that the protective effect of the haplogroup J affects only an age-related and oxidative stress disease such as OA (18).

Otherwise, a retrospective study carried out by our group in a well characterized follow-up cohort of 281 OA patients, revealed that mtDNA haplogroups also influence the radiographic progression of OA, so that patients with the most common European mtDNA haplogroup H are more apt to require joint replacement surgery than non-H carriers (Hazard Ratio (HR) 1.441; 95% CI 1.002 – 2.073; p=0.049). In this study, OA progression was defined as any radiographic worsening of the hip or knee K/L score in a follow-up period not less than 36 months, and total knee or hip replacement was recorded and considered as an outcome. Besides, to control for possible confusion bias, a multiple Cox regression analysis that permitted to analyze the influence of mtDNA haplogroups on radiographic OA progression probability in the follow-up, after adjusting for other non-genetic risk factors, such as age, gender and BMI, was also performed (Fernández-Moreno *in press* 2012).

A possible explanation for these findings could be related to biochemical differences between mtDNA haplogroups J and H (Figure 2). The partially uncoupled OXPHOS system in carriers of haplogroup J leads to an increased oxidation of the MRC and, therefore, a lower ROS production and apoptosis (21, 26, 29), two key factors involved in the development of OA (12, 14). On the contrary, mtDNA haplogroup H has the strongest OXPHOS coupling efficiency and ATP production, probably because of its high level of conserved aminoacids (29), and it is also the highest oxygen uptake consumer (30). These features related to its high performance are accompanied by an augmented production of ROS, increasing cellular damage and apoptosis (21). Therefore, the elevated levels of ROS found in haplogroup H carriers may be the reason why OA patients with this haplogroup are more likely to have more severe OA progression that leads to joint replacement.

A recent work carried out by our group analyzed the influence of mtDNA haplogroups in a well characterized cohort of 453 OA patients and 280 healthy controls from the United Kingdom (UK). The results obtained showed that mtDNA haplogroup T is a protective factor against knee OA in the UK (OR 0.581; 95% CI 0.365 - 0.926; p=0.021) (Soto-Hermida *in press* 2012).



Mitochondrial genetics in osteoarthritis

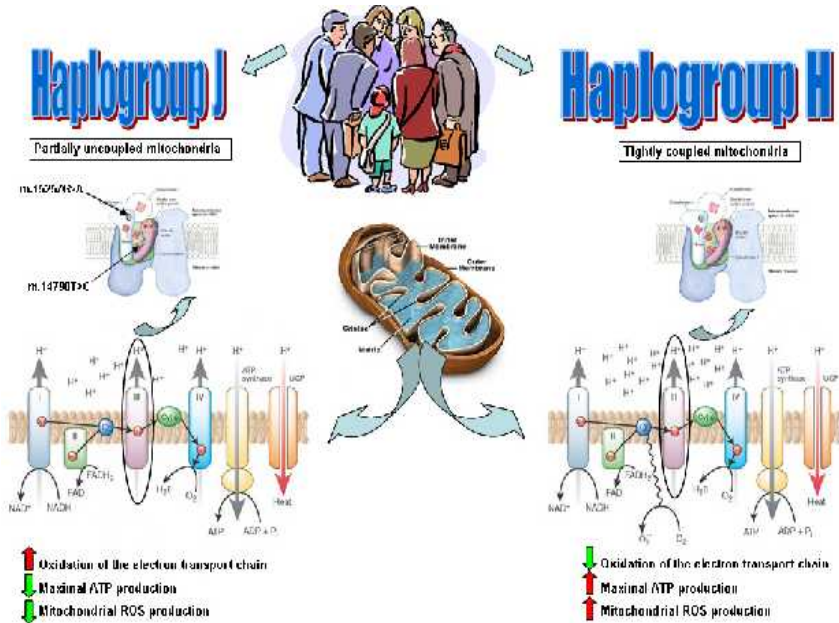


Figure 2. Scheme showing some of the polymorphisms of the mtDNA haplogroup J, compared with haplogroup H, which result in differences in energy metabolism and altered mitochondrial oxidative damage, affecting health and longevity.

This population/geographic specific association may be explained by the fact that these two mtDNA variants (J and T) could represent an advantage to each of the different environmental conditions in northern Spain and in the UK respectively, as described in other cases (31). In fact, both haplogroups J and T have been described as sister haplogroups that share a common root, the m.4216t>c polymorphism (Figure 1b) (21), which means that mtDNA haplogroup T is also characterized by a partially uncoupled OXPHOS system, being related to lower ATP production (22, 32), and therefore a reduced ROS production is also expected (20, 21, 26). Therefore, the conclusion of these findings is the partially uncoupled OXPHOS system, characteristic of these two haplogroups, as the main cause of the protective role of both mtDNA haplogroups J and T against OA in Spain and UK respectively.

3.2. mtDNA haplogroups and OA-related biomarkers

Molecular markers in OA have been developed in order to detect changes in OA with more reliability and sensitivity, preferably in an earlier stage of the disease (33). These markers are molecules released into biological fluids during the process of tissue biosynthesis and turnover, and can be easily detected by immunoassays. Several molecular markers of bone, cartilage and synovium have been described as useful for early identification of patients with OA (34). In this context, interesting associations between

the mtDNA haplogroups and some OA-related biomarkers have been described. In a recent work comparing the serum levels of type II collagen OA biomarkers between 75 OA patients and 75 healthy controls with haplogroups H, J or U, the authors showed that OA patients with the mtDNA haplogroup J had significantly lower serum levels of cartilage degradation markers (Coll2-1, Coll2-1NO₂, C2C) than carriers of the haplogroup H ($p \leq 0.01$ in all cases) (35). Similarly, the same authors also analyzed the influence of mtDNA haplogroups on serum levels of proteolytic enzymes in the same cohort of patients described above, concluding that the influence of these mitochondrial variants on serum levels of metalloproteinase 3 (MMP-3) was clearly dependent on the diagnosis ($p=0.027$), whereas the influence on serum levels of MMP-13 is independent of diagnosis ($p=0.035$), so that carriers of haplogroup J showed the lowest serum levels (36). As a consequence of these two works, the authors suggest to use mtDNA haplogroups as complementary molecular markers when the above mentioned protein markers are used for diagnosis of OA.

Following this line of mtDNA haplogroups-modulated proteins, and taking into account the particular characteristics by which some of the haplogroups are related to lower ROS production (21, 26), the authors analyzed their possible involvement on serum levels of certain antioxidant proteins, such as Catalase and

Mitochondrial genetics in osteoarthritis

Manganese Superoxide dismutase (MnSOD). No relationships between mtDNA haplogroups and serum levels of MnSOD were found, but a slight influence of mtDNA haplogroup J on serum levels of catalase was detected, so that carriers of haplogroup J showed higher serum levels than non-J carriers ($p=0.057$) (37).

All the associations with serum levels of different OA-related (potential) molecular markers are probably due to the different metabolic characteristics of mtDNA haplogroups, by which some of them show a different performance of the OXPHOS system (22, 38). This different metabolic profile leads to a different behaviour of the mitochondria in terms of OA-related features such as energy production, glucose metabolism, oxygen consumption, apoptosis, ROS production or calcium accumulation.

3.3. mtDNA haplogroups and OA-related features

Mitochondria play an integral role in ATP production in cells and are involved in glucose metabolism, insulin secretion and regulation of apoptosis (39). Besides, MRC is one of the most important sites of ROS production; specifically, complex I and III have been suggested to be the major ROS source (14). All these mitochondrion-related features, together with alterations in OXPHOS, are characteristic of disease syndromes with neurological, muscular or metabolic manifestations. In addition, oxidative stress within mitochondria can lead to a vicious cycle in which damaged mitochondria produce increased amount of ROS, leading in turn to progressive augmentation in both mitochondrial damage and somatic mutations. This sequence is one of the proposed causes of aging and degenerative diseases, like OA.

These many lines of evidence suggest a "mitochondrial" hypothesis of disease, and population genetic analysis suggests that common mtDNA variants or haplogroups may be relevant to longevity (40), neurodegenerative diseases (41), and metabolic traits like BMI (42) or type 2 diabetes (43). In this regard, a significant association of the mtDNA haplogroup X with decreased BMI and body fat mass (BFM) was demonstrated (42), and our group found an statistical association of mtDNA haplogroup J with lower BMI in a large cohort of samples from the north of Spain (personal data); however, other authors showed no significant associations of mtDNA haplogroups with metabolic traits including BMI (44).

3.4. mtDNA haplogroups and longevity

The mitochondria have been continually implicated in the aging process (29). Mitochondrial ROS are the major source of oxidative damage within the cell and lie at the heart of one of the most prominent theories postulated, the free radical theory of aging (45-47). The ROS produced cause cumulative damage to cellular constituents, DNA, RNA, proteins and lipids, resulting in aging and eventual death.

Successful aging and longevity are the result of the interaction between a variety of genes, environmental

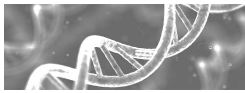
conditions and lifestyles; however, the hypothesis that mtDNA haplogroups play a role in longevity has been widely investigated. Three independent studies showed an overrepresentation of the haplogroup J in healthy centenarians compared to young individuals from Northern Italy (48), Northern Ireland (49) and Finland (40). In Spain, an accumulation of the haplogroup J in elderly individuals from Pyrenees Mountains was also detected, concluding that this mtDNA inherited variant could present a phenotypic survival advantage to environmental conditions (31). Similarly, several studies demonstrated the influence of Asian mtDNA haplogroups with longevity in the Japanese population (50-52). However, other studies did not find correlations between mtDNA haplogroups and successful aging probably because, as for other genetic factors, the association of mtDNA inherited variants with longevity is population/geographic specific (31, 53).

The possible explanation for these findings would be the same than for the OA. The partially uncoupled OXPHOS system of haplogroup J (Figure 2) would lead to a lower ROS production, resulting in less damage to cellular constituents, DNA, RNA, proteins and lipids and therefore in successful aging.

3.5. mtDNA haplogroups, Nitric Oxide (NO) and telomere damage

A growing body of evidence suggests that overproduction of NO is involved in the pathogenesis of OA (14, 54). NO inhibits ATP production by competing with oxygen to bind to cytochrome c oxidase on the mitochondria, thereby inhibiting the electron transport chain and the generation of ATP (55, 56); however, the most destructive effects of NO in articular cartilage are related to the ability of NO to combine with superoxide anions (O_2^-) to generate peroxynitrite (ONOO⁻) (57, 58). This strong oxidant induces not only damage to DNA, proteins and lipids, resulting in a loss of extracellular matrix and cell death (54, 59, 60), but also directly injure the guanine repeats in the telomere DNA, indicating that oxidative stress directly leads to telomere erosion, regardless of cell division (61, 62).

In a recent study carried out by Fernández-Moreno and collaborators (63), mtDNA haplogroup J appeared to be associated with a longer telomere length in peripheral blood leukocytes (PBLs) from 114 J and 52 non-J samples ($p=0.025$), as well as with lower NO production and iNOS mRNA expression in chondrocytes ($p=0.043$), confirming that carriers of this haplogroup suffer from less oxidative stress. This is probably due to the more oxidized MRC in carriers of this haplogroup that leads to a decreased generation of superoxide anion (O_2^-) and, therefore, a lower ONOO⁻ production and lower telomere damage. Besides, since mitochondria are involved in the NO production through the reduction of nitrite by cytochrome c oxidase and regulated by oxygen on multiple levels (64, 65), and mtDNA haplogroup J show a lower oxygen consumption (30), we speculate that this could be one of the reasons why carriers of this haplogroup also show lower NO production.



Mitochondrial genetics in osteoarthritis

4. mtDNA DAMAGE AND OA

As stated above, there is a growing body of evidence indicating that mtDNA damage, caused by ROS and/or reactive nitrogen species (RNS) is involved in cellular dysfunction and death, and could play a causal role in disorders linked to the excessive generation of ROS. ROS-induced mtDNA damage leads to mtDNA mutations which in turn can lead to the synthesis of functionally impaired respiratory chain subunits, causing MRC dysfunction and augmented ROS production. This vicious cycle increases over time, resulting in enhanced aging and degenerative diseases.

Recent studies showed not only that mtDNA damage accumulates in OA chondrocytes, strengthening the presence of mitochondrial oxidative stress in these cells during disease progression, but also that OA chondrocytes have limited mtDNA repair capacity, indicating that these cells are less able to recover from free radical-induced damage (15). Another striking finding is related to the main proinflammatory cytokines that play a pivotal role in the development of OA, Interleukin-1 (IL-1) and Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), and their incidence in the mtDNA damage; IL-1 and TNF-alpha, which regulate apoptosis differently in human chondrocytes (66), disturb normal mitochondrial function in these cells by decreasing energy production and mitochondrial respiration; however, mitochondria from OA chondrocytes are more susceptible to damage induced by proinflammatory cytokines than mitochondria from normal chondrocytes. Otherwise, protection of human chondrocytes with the repair enzyme hOGG1 rescues mtDNA integrity, decreases mitochondrial ROS production, preserves ATP levels and greatly diminishes apoptosis following IL-1 and TNF-alpha exposure. With this scenario, the authors concluded that mtDNA damage plays a pivotal role in the mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by proinflammatory cytokines (16).

5. CONCLUSION

It is clearly demonstrated that mitochondrial functions are altered in OA chondrocytes, and recent findings revealed that mtDNA inherited variants, called haplogroups, play a main role in the prevalence and progression of OA. These mitochondrial polymorphisms are also involved in several OA-related features; specifically, the mtDNA haplogroup J is associated with decreased serum levels of cartilage degradation biomarkers, lower BMI, as well as with lower NO production and longer telomere length. On the contrary, the most energetically efficient haplogroup H is related to increased serum levels of cartilage degradation biomarkers and increased risk of joint replacement surgery. We conclude that the effect of the mtDNA haplogroups in the development of the OA disease is mainly related to the ROS production, thus mainly affecting those OA phenotypes ROS-related.

Otherwise, mitochondria are the main source of ROS and also RNS, and increased ROS production and NO in human chondrocytes leads to mtDNA damage, proteins

and lipids, causing an increased mitochondrial dysfunction that ultimately leads to the loss of extracellular matrix and cell death. In summary, the influence of the mitochondria and mitochondrial genetics in the OA disease is well documented, however, in order to strengthen this role it will be necessary to demonstrate these findings in appropriate animal models and in larger cohort of patients.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

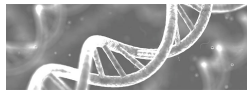
The authors express appreciation to Lourdes Sanjurjo and Maria Dolores Velo and to the Department of Orthopaedic Surgery from the CHU A Coruña. This study was supported by grants from Fundación Española de Reumatología (programa GEN-SER) and from Fondo Investigación Sanitaria (CIBER- CB06/01/0040)-Spain, Fondo Investigación Sanitaria-PI 08/2028 Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, with participation of funds from FEDER (European Community). Ignacio Rego was supported by Contrato de Apoyo a la Investigación-Fondo Investigación Sanitaria (CA10/01564). This study's sponsors had no involvement in the study design.

7. REFERENCES

1. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 41,1343-1355 (1995)
2. Dieppe PA, Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 365,965-973 (2005)
3. Valdes AM, Spector TD. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. United States, 23-32 (2011)
4. Valdes AM, Spector TD. The genetic epidemiology of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 22, 139-143 (2010)
5. Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, Schafer AJ, Spector TD. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 50, 2497-2507 (2004)
6. Attur M, Wang HY, Kraus VB, Bukowski JF, Aziz N, Krasnokutsky S, Samuels J, Greenberg J, McDaniel G, Abramson SB, Kornman KS. Radiographic severity of knee osteoarthritis is conditional on interleukin 1 receptor antagonist gene variations. *Ann Rheum Dis*. England, 856-861 (2010)
7. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, Fujioka M, Sudo A, Uchida A, Yamamoto S, Ozaki K, Takigawa M, Tanaka T, Nakamura Y, Jiang Q, Ikegawa S. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 39, 529-533 (2007)
8. Valdes AM, Evangelou E, Kerkhof HJ, Tamm A, Doherty SA, Kisand K, Kerna I, Uitterlinden A, Hofman A,

Mitochondrial genetics in osteoarthritis

- Rivadeneira F, Cooper C, Dennison EM, Zhang W, Muir KR, Ioannidis JP, Wheeler M, Maciewicz RA, van Meurs JB, Arden NK, Spector TD, Doherty M. The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance. *Ann Rheum Dis* 70, 873-875 (2011)
9. Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7, 161-169 (2011)
10. Maneiro E, Martin MA, de Andres MC, Lopez-Armada MJ, Fernandez-Sueiro JL, del Hoyo P, Galdo F, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 48, 700-708 (2003)
11. Cillero-Pastor B, Carames B, Lires-Dean M, Vaamonde-Garcia C, Blanco FJ, Lopez-Armada MJ, Blanco FJ. Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 58, 2409-2419 (2008)
12. Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets* 8, 333-345 (2007)
13. Blanco FJ, Lopez-Armada MJ, Maneiro E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion*. Netherlands, 715-728 (2004)
14. Henrotin Y, Kurz B. Antioxidant to treat osteoarthritis: dream or reality? *Curr Drug Targets* 8, 347-357 (2007)
15. Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall AW. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 107-113 (2009)
16. Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Pearsall AW, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 424-432 (2010)
17. 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* 58, 2387-2396 (2008)
18. Rego I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-López C, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A, Arenas J, Blanco FJ. Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Ann Rheum Dis* 69, 210-213 (2010)
19. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144, 1835-1850 (1996)
20. Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, Brandon M, Easley K, Chen E, Brown MD, Sukernik RI, Olckers A, Wallace DC. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States, 171-176. (2003)
21. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303, 223-226 (2004)
22. Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Díaz M, Urries A, Montoro L, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet* 67, 682-696 (2000)
23. van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, Pericak-Vance MA, Vance JM, . Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 72, 804-811 (2003)
24. Gallardo ME, Garcia-Pavia P, Chamorro R, Vazquez ME, Gomez-Bueno M, Millan I, Almoguera B, Domingo V, Segovia J, Vilches C, Alonso-Pulpon L, Garesse R, Bornstein B. Mitochondrial haplogroups associated with end-stage heart failure and coronary allograft vasculopathy in heart transplant patients. *Eur Heart J*. (2011)
25. Ambrose SH. Late Pleistocene human population bottlenecks, volcanic winter, and differentiation of modern humans. *J Hum Evol* 34, 623-651 (1998)
26. Wallace DC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68, 479-486 (2003)
27. Chang MC, Hung SC, Chen WY, Chen TL, Lee CF, Lee HC, Wang KL, Chiou CC, Wei YH. Accumulation of mitochondrial DNA with 4977-bp deletion in knee cartilage—an association with idiopathic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 1004-1011 (2005)
28. Lu HB, Zhou Y, Hu JZ, Lei GH, Zhu M, Li KH. Mitochondrial DNA deletion mutations in articular chondrocytes of cartilage affected by osteoarthritis. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 31, 640-644 (2006)
29. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488 (1999)
30. Martínez-Redondo D, Marcuello A, Casajus JA, Ara I, Dahmani Y, Montoya J, Ruiz-Pesini E, Lopez-Perez MJ, Díez-Sánchez C. Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO2max consumer—is it a paradox? *Mitochondrion* 10, 102-107 (2010)



Mitochondrial genetics in osteoarthritis

31. Dominguez-Garrido E, Martinez-Redondo D, Martin-Ruiz C, Gomez-Duran A, Ruiz-Pesini E, Madero P, Tamparillas M, Montoya J, von Zglinicki T, Diez-Sanchez T, Lopez-Perez MJ. Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations. *Biogerontology* 10, 435-442 (2009)
32. Castro MG, Terrados N, Reguero JR, Alvarez V, Coto E. Mitochondrial haplogroup T is negatively associated with the status of elite endurance athlete. *Mitochondrion* 7, 354-357 (2007)
33. Garnero P, Delmas PD. Biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 15, 641-646 (2003)
34. Rousseau JC, Delmas PD. Biological markers in osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 346-356 (2007)
35. Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Deberg M, Pertega S, Fernandez-Lopez C, Oreiro N, Henrotin Y, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 69, 910-917 (2010)
36. Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Deberg M, Pertega S, Fernandez-Lopez C, Oreiro N, Henrotin Y, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. England, 646-652 (2011)
37. Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Pertega S, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, Rego-Perez I, Blanco FJ. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and serum levels of anti-oxidant enzymes in patients with osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 12, 264 (2011)
38. Gomez-Duran A, Pacheu-Grau D, Lopez-Gallardo E, Diez-Sanchez C, Montoya J, Lopez-Perez MJ, Ruiz-Pesini E. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet* 19, 3343-3353 (2010)
39. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39, 359-407 (2005)
40. Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylha M, Majamaa K. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet* 112, 29-33 (2003)
41. Lakatos A, Derbeneva O, Younes D, Keator D, Bakken T, Lvova M, Brandon M, Guffanti G, Reglodi D, Saykin A, Weiner M, Macciardi F, Schork N, Wallace DC, Potkin SG. Alzheimer's disease neuroimaging initiative. Association between mitochondrial DNA variations and Alzheimer's disease in the ADNI cohort. *Neurobiol Aging* 31, 1355-1363 (2010)
42. Yang TL, Guo Y, Shen H, Lei SF, Liu YJ, Li J, Liu YZ, Yu N, Chen J, Xu T, Cheng Y, Tian Q, Yu P, Papiasian CJ, Deng HW. Genetic association study of common mitochondrial variants on body fat mass. *PLoS One* 6, e21595 (2011)
43. Feder J, Ovadia O, Blech I, Cohen J, Wainstein J, Harman-Boehm I, Glaser B, Mishmar D. Parental diabetes status reveals association of mitochondrial DNA haplogroup J1 with type 2 diabetes. *BMC Med Genet* 10, 60 (2009)
44. Saxena R, de Bakker PI, Singer K, Mootha V, Burt N, Hirschhorn JN, Gaudet D, Isomaa B, Daly MJ, Groop L, Ardlie KG, Altshuler D. Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease. *Am J Hum Genet* 79, 54-61 (2006)
45. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581 (1998)
46. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 222-230 (2000)
47. Sastre J, Pallardó FV, Viña J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life* 49, 427-435 (2000)
48. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, Bonafe M, Monti D, Baggio B, Bertolini S, Mari D, Mattace R, Franceschi C. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J* 13, 1532-1536 (1999)
49. Ross OA, McCormack R, Curran MD, Duguid RA, Barnett YA, Rea IM, Middleton D. Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population. *Exp Gerontol* 36, 1161-1178 (2001)
50. Bilal E, Rabadan R, Alexe G, Fuku N, Ueno H, Nishigaki Y, Fujita Y, Ito M, Arai Y, Hirose N, Ruckenstein A, Bhanot G, Tanaka M. Mitochondrial DNA haplogroup D4a is a marker for extreme longevity in Japan. *PLoS One* 3, e2421 (2008)
51. Takasaki S. Mitochondrial haplogroups associated with Japanese centenarians, Alzheimer's patients, Parkinson's patients, type 2 diabetic patients and healthy non-obese young males. *J Genet Genomics* 36, 425-434 (2009)
52. Nishigaki Y, Fuku N, Tanaka M. Mitochondrial haplogroups associated with lifestyle-related diseases and longevity in the Japanese population. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1, S221-235 (2010)
53. Dato S, Passarino G, Rose G, Altomare K, Bellizzi D, Mari V, Feraco E, Franceschi C, De Benedictis G. Association of the mitochondrial DNA haplogroup J with longevity is population specific. *Eur J Hum Genet* 12, 1080-1082 (2004)
54. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 146, 75-85 (1995)

Mitochondrial genetics in osteoarthritis

55. Stefanovic-Racic M, Stadler J, Georgescu HI, Evans CH. Nitric oxide and energy production in articular chondrocytes. *J Cell Physiol* 159, 274-280 (1994)

56. Maneiro E, Lopez-Armada MJ, de Andres MC, Carames B, Martin MA, Bonilla A, Del Hoyo P, Galdo F, Arenas J, Blanco FJ. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 64, 388-395 (2005)

57. Terkeltaub R, Johnson K, Murphy A, Ghosh S. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion* 1, 301-319 (2002)

58. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87, 315-424 (2007)

59. Kuhn K, Shikhan AR, Lotz M. Role of nitric oxide, reactive oxygen species, and p38 MAP kinase in the regulation of human chondrocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 197, 379-387 (2003)

60. Davies CM, Guilak F, Weinberg JB, Fermor B. Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 624-630 (2008)

61. Yermilov V, Rubio J, Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite *in vitro* and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett* 376, 207-210 (1995)

62. Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 7, R380-391 (2005)

63. Fernandez-Moreno M, Tamayo M, Soto-Hermida A, Mosquera A, Oreiror N, Fernandez-Lopez C, Fernandez JL, Rego-Perez I, Blanco FJ. mtDNA Haplogroup J Modulates Telomere Length and Nitric Oxide Production. *BMC Musculoskelet Disord* 12, 283 (2011)

64. Reutov VP, Sorokina EG. NO-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. *Biochemistry* 63, 874-884 (1998)

65. Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide* 22, 64-74 (2010)

66. Carames B, Lopez-Armada MJ, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Vaamonde C, Galdo F, Blanco FJ. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta on cell death in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 715-722 (2008)

Abbreviations: ATP: adenosine triphosphate, BMI: body mass index, BP: base pair, CI: confidence interval, Coll2-1: denaturation epitope of the triple helical domain of the

collagen type II, Coll2-1NO₂: nitrated form of the denaturation epitope of the triple helical domain of the collagen type II, C2C: C-terminal neoepitope generated by the collagenase-mediated cleavage of collagen type II triple helix, DNA: deoxyribonucleic acid, ETC: electron transport chain, GDF-5: growth differentiation factor-5, GWAS: genome wide association studies, hOGG1: 8-oxoguanine DNA glycosylase, HR: hazard ratio, IL-1: interleukin-1, iNOS: inducible nitric oxide synthase, K/L: Kellgren and Lawrence, LHON: leber's hereditary optic neuropathy, MnSOD: manganese superoxide dismutase, MMP-3: metalloproteinase-3, MMP-13: metalloproteinase-13, MRC: mitochondrial respiratory chain, mRNA: messenger ribonucleic acid, mtDNA: mitochondrial deoxyribonucleic acid, NO: nitric oxide, OA: osteoarthritis, ONOO⁻: peroxynitrite, OR: odds ratio, OXPHOS: oxidative phosphorylation system, O₂⁻: superoxide anion, PBL: peripheral blood leukocytes, RNA: ribonucleic acid, RNS: reactive nitrogen species, ROS: reactive oxygen species, SNP: single nucleotide polymorphism, TNF-alpha: tumor necrosis factor-alpha, UK: United Kingdom

Key Words: Mitochondria, Genetics, Biomarkers, Osteoarthritis, Cartilage, Arthritis, Review

Send correspondence to: Francisco J. Blanco, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruna, 15006-A Coruna, Spain, Tel: 34 981 176399, Fax: 34 981 176398, E-mail: fblagar@sergas.es

EXTENDED REPORT

Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients

Juan Fernández-Tajes,¹ Angel Soto-Hermida,¹ Maria E Vázquez-Mosquera,¹ Estefanía Cortés-Pereira,¹ Alejandro Mosquera,² Mercedes Fernández-Moreno,¹ Natividad Oreiro,¹ Carlos Fernández-López,¹ Jose Luis Fernández,² Ignacio Rego-Pérez,¹ Francisco J Blanco^{1,3,4}

Handling editor Tore K Kvien

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202783>).

¹Rheumatology Division, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), Coruña, Spain
²Genetics Unit, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), Coruña, Spain
³Proteo-Red/ISCIII, Madrid, Spain
⁴CIBER-BBN-ISCIII, Madrid, Spain

Correspondence to
 Dr Francisco J Blanco and
 Dr Ignacio Rego-Pérez
 Rheumatology Division,
 Hospital Universitario A
 Coruña, Coruña 15006-A,
 Spain;
 fblagar@sergas.es

Accepted 16 February 2013

ABSTRACT

Objective Alterations in DNA methylation patterns have been found to correlate with several diseases including osteoarthritis (OA). The aim of this study was to identify, for the first time, the genome-wide DNA methylation profiles of human articular chondrocytes from OA cartilage and healthy control cartilage samples.

Methods DNA methylation profiling was performed using Illumina Infinium HumanMethylation27 in 25 patients with OA and 20 healthy controls. Subsequent validation was performed by genome-wide expression analysis using the Affymetrix Human Gene 1.1 ST array in an independent cohort of 24 patients with OA. Finally, the most consistent genes in both assays were amplified by quantitative reverse transcriptase PCR in a validation cohort of 48 patients using microfluidic real-time quantitative PCR. Appropriate bioinformatics analyses were carried out using R bioconductor software packages and qBase plus software from Biogazelle.

Results We found 91 differentially methylated (DM) probes, which permitted us to separate patients with OA from healthy controls. Among the patients with OA, we detected 1357 DM probes that identified a tight cluster of seven patients who were different from the rest. This cluster was also identified by genome-wide expression in which 450 genes were differentially expressed. Further validation of the most consistent genes in an independent cohort of patients with OA permitted us to identify this cluster, which was characterised by increased inflammatory processes.

Conclusions We were able to identify a tight subgroup of patients with OA, characterised by an increased inflammatory response that could be regulated by epigenetics. The identification and isolation of this subgroup may be critical for the development of effective treatment and disease prevention.

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is a chronic musculoskeletal disease related to aging that is characterised by the progressive destruction of the extracellular matrix of articular cartilage, as well as bone remodelling and synovial inflammation, which leads to pain and severe impairment of mobility. It is the main cause of work incapacity and one of the most common reasons for visiting a primary care physician; its prevalence reaches 40% of people over the age

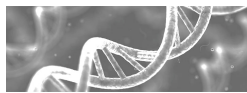
of 70,¹ and there is no basic treatment. Age, obesity, body mass index, behavioural influences and both nuclear and mitochondrial genetics are all risk factors^{2–4}; however, in the last few years, the role played by epigenetics in the pathogenesis of the disease has been investigated in more detail.^{5–8}

Epigenetics is defined as heritable changes in genome function without changes in the DNA sequence. While the genetic code is the same for every somatic cell, epigenetic changes are usually confined to specific cells or tissues, or even to specific cells within a tissue. Epigenetics mechanisms must be considered in order to understand the gene–environment interactions that lead to complex diseases,⁹ and OA is no exception. DNA methylation is the best characterised epigenetic mechanism, and its major goal is gene silencing.¹⁰ It consists of the addition of a methyl group (CH₃) to cytosine that is 5' to guanine to form methylated cytosine (M^cC). These sites are usually located in promoter regions and are called CpG sites.

DNA methylation is an essential mechanism for (i) imprinting of specific genes, (ii) X chromosome inactivation in women, and (iii), important in the present context, cell-type-specific gene expression. In this regard, since it has been suggested that osteoarthritic chondrocytes possess a modulated phenotype^{11–12} by which several genes are up- or down-regulated compared with normal chondrocytes,¹³ and the regulatory mechanisms responsible for these alterations have not yet been clarified, it has been suggested that epigenetic changes in the methylation status of the promoter region of the genomic DNA contribute to the pathology of OA.^{5,12}

To date, epigenetic gene regulation has been widely studied in cancer,^{14–16} but very few studies on OA have been performed. One of the first investigations of OA showed that overexpression of cartilage-degrading enzymes by late-stage OA chondrocytes, mainly matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), MMP-9, MMP-13 and ADAMTS-4, may have resulted from epigenetic changes in the methylation status of CpG sites in the promoter regions of these enzymes^{12,17}; in addition, epigenetic changes in the promoter region of the leptin gene result in modulated expression of MMP-13.¹³ It has also been postulated that a DNA

To cite: Fernández-Tajes J, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, et al. *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2012-202783



Clinical and epidemiological research

demethylation process takes place at specific CpG sites in the interleukin-1 β promoter in response to inflammatory cytokines in human chondrocytes,¹⁸ and even the DNA methylation pattern in the promoter region of this gene is also altered after treatment with glucosamine and a nuclear factor-kappa β inhibitor.¹⁹ It has furthermore been demonstrated that the genetic effect of the rs143383 single-nucleotide polymorphism on expression of growth differentiation factor 5 (GDF5) in OA disease is regulated epigenetically by DNA methylation.²⁰ Other genes related to the oxidative stress process, such as manganese superoxide dismutase, which is repressed in OA chondrocytes,²¹ has been shown to be regulated by epigenetics.²² In contrast, a total DNA methylation assay performed by Sesselmann and colleagues²³ showed no differences between healthy control and OA cartilage by chromatographic approaches. Another recent study, consisting of a genome-wide methylation approach, revealed differentially methylated (DM) regions in osteoporotic and OA bones.²⁴

Taking all this into account, we examined for the first time the genome-wide DNA methylation profile of human articular chondrocytes from OA and healthy control cartilage samples to identify profiles of DNA methylation in OA disease. By examining the gene pathways involved, as well as the genomic context of the loci with OA-associated methylation, we provide insight into potentially altered biological processes related to these profiles.

MATERIALS AND METHODS

The scheme we followed to carry out the present work is described in online supplementary figure S1.

Samples

Three groups of samples from Hospital Universitario A Coruña were analysed (see online supplementary table S1). All patients included in this study had knee OA K/L grade IV and underwent knee prosthesis surgery; normal human cartilages were obtained at autopsy from cadavers with no macroscopic signs of OA. All cartilage samples were collected from the central area of the tibial plateau of the knee and represent a mixture of superficial, intermediate and deep layers of articular cartilage. Informed consent was obtained from all participants, and the study was approved by the clinical ethics committee of Galicia (see online supplementary materials and methods).

Nucleic acid (DNA and RNA) isolation and reverse transcription

DNA was isolated following a home-made CetylTrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) and chloroform-based method after breaking up the cartilage. For RNA isolation, cartilage samples were disrupted using a mortar, after freezing in liquid nitrogen before using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany). After isolation, the RNA was reverse transcribed to cDNA (see online supplementary materials and methods).

DNA methylation profiling

DNA methylation profiling was performed using the Infinium HumanMethylation27 beadchip (Illumina, San Diego, California, USA), which allows interrogation of 27 578 highly informative CpG sites located within the proximal promoter regions of 14 495 genes and 110 microRNAs (see online supplementary materials and methods). The methylation data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the GEO accession number GSE43269.

Data filtering, normalisation and analysis of methylation data

As a result of data filtering, four samples (two patients with OA and two healthy controls) showed a detection *p* value >0.05 in more than 25% of all probes; consequently, these samples were removed from further analyses, resulting in 23 patients with OA and 18 healthy controls. After normalisation, *M*-values followed a bimodal distribution (see online supplementary figure S2). The statistical procedures used to analyse the DM sites are described in online supplementary materials and methods.

Unsupervised clustering of methylation data

A resampling-based unsupervised consensus clustering of the DNA methylation dataset, using the 23 837 selected probes that followed the initially established criteria, was performed to distinguish different groups²⁵ (see online supplementary materials and methods).

Gene expression profiling and data analysis from gene expression

The platform used for this purpose was the Affymetrix Human Gene 1.1 ST array plate (Affymetrix, Santa Clara, California, USA). A principal component analysis (PCA) using the 7742 probes selected after initial non-specific filtering was carried out in order to visualise possible clusters within samples. The normalisation processes as well as the procedure to analyse the differentially expressed probes are described in online supplementary materials and methods. The expression data have been deposited in the NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the GEO accession number GSE43191.

Gene ontology analyses

Functional characteristics consisted of an over-representation analysis of the gene ontology (GO) categories which appeared enriched in the selected lists of the DM/expressed genes examined using the DAVID (Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery) bioinformatics database functional tool.²⁶

Validation of genes

The expression levels of those genes in which an inverse relationship between methylation and expression was detected were subsequently analysed in an independent cohort of 48 patients with OA using microfluidic real-time quantitative PCR. The data analyses were carried out with qBase plus software (Biogazelle, Ghent University, Belgium) and R Bioconductor software, and included qualitative, quantitative and hierarchical approaches to validate and identify clusters of patients. The genes hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1 (HPRT1) and ribosomal protein L13A (RPL13A) were used as constitutive genes. Four of the 48 samples (RNAs) did not meet the quality criteria and were therefore removed from further analyses.

RESULTS

DNA methylation pattern in patients with OA and healthy controls

A total of 91 DM probes in patients with OA and healthy controls were detected (table 1), permitting us to distinguish the two groups of samples (see online supplementary figure S3a). Of these, 37 were less methylated in OA samples and 54 were more methylated in OA samples compared with healthy controls. The runt-related transcription factor-1 (RUNX1) gene was the least methylated gene and the *msh* homeobox-1 (MSX1)

Table 1 Differentially methylated probes in osteoarthritic cartilage samples and healthy cartilage samples sorted by decreased mean difference in β values on each of the main categories

Increased methylation in OA				Decreased methylation in OA								
Gene symbol	B	Adjusted p value	Mean β value in healthy cartilage	Mean β value in OA cartilage	Mean difference (healthy-OA)	Adjusted p value	Mean β value in healthy cartilage	Mean β value in OA cartilage	Mean difference (healthy-OA)			
Regulation of phosphorylation and protein kinase cascade												
CDKN2B	4.3094	0.0110	0.2979	0.4773	-0.1793	1.0663	0.0351	0.6656	0.5450	0.1205		
SOC51	4.8987	0.0099	0.1082	0.2489	-0.1407	3.0698	0.0155	0.5701	0.4715	0.0986		
CDKN2B	1.8826	0.0275	0.3545	0.4902	-0.1357	1.1575	0.0351	0.7078	0.6242	0.0836		
PTF6	1.0225	0.0351	0.0821	0.2027	-0.1205	3.7792	0.0140	0.6690	0.5856	0.0835		
CDKN2B	1.2742	0.0333	0.3807	0.4942	-0.1135	2.8196	0.0180	0.5217	0.4510	0.0706		
GRB10	1.5904	0.0304	0.3708	0.4759	-0.1051	1.2667	0.0333	0.2807	0.2137	0.0670		
HCR1	1.0565	0.0351	0.3741	0.4616	-0.0875	1.6784	0.0300	0.8027	0.7379	0.0648		
TRH	1.3573	0.0323	0.6049	0.6829	-0.0780	3.4044	0.0142	0.8648	0.8047	0.0601		
INSR	1.6358	0.0300	0.0615	0.1244	-0.0628	MS4A1	2.4676	0.0202	0.8766	0.8310	0.0456	
CDK20	2.6537	0.0199	0.0606	0.1081	-0.0475	ENG	1.9630	0.0275	0.0739	0.0499	0.0240	
GRIA2	3.3251	0.0146	0.0920	0.1328	-0.0409	Positive regulation of transcription activity						
HIST1H4H	1.3440	0.0323	0.1224	0.1619	-0.0395	RUNX1	5.5466	0.0064	0.7283	0.4489	0.2794	
FGD4	1.8371	0.0283	0.1093	0.1475	-0.0382	NR1B	3.1543	0.0155	0.6779	0.5940	0.0839	
MTTH	1.0460	0.0351	0.0532	0.0806	-0.0274	AIP	1.3821	0.0323	0.7295	0.6513	0.0782	
NAG5	3.4612	0.0142	0.0551	0.0817	-0.0266	SKAP1	1.2295	0.0341	0.7221	0.6852	0.0369	
MARK8/1P1	1.1392	0.0351	0.0388	0.0519	-0.0131	ZNF287	1.4984	0.0318	0.0914	0.0708	0.0205	
Morphogenesis/development												
MSX1	1.4404	0.0318	0.2801	0.5006	-0.2205	KRT80	3.5448	0.0142	0.8274	0.6745	0.1529	
SALL4	2.5070	0.0202	0.1734	0.3424	-0.1690	WIPF1	3.4699	0.0142	0.8678	0.7753	0.0925	
TBX4	4.4522	0.0110	0.0578	0.1985	-0.1408	Ion transport/binding						
MSX1	1.1438	0.0351	0.2810	0.4130	-0.1320	BEST3	1.4726	0.0318	0.7967	0.6497	0.1470	
MSX1	2.0345	0.0269	0.2453	0.3712	-0.1259	S100A10	2.1543	0.0242	0.5992	0.4864	0.1127	
TBX4	6.1014	0.0064	0.0723	0.1875	-0.1151	CP	1.9186	0.0275	0.4805	0.3754	0.1051	
KRT5	2.7673	0.0182	0.6131	0.7049	-0.0918	EMR2	3.8221	0.0140	0.4613	0.3646	0.0967	
SPINT1	1.6514	0.0300	0.1835	0.2379	-0.0544	EDARADD	1.5031	0.0318	0.7905	0.6950	0.0955	
Negative regulation of transcription												
RORC	1.0271	0.0351	0.0829	0.2016	-0.1187	MTZA	2.4192	0.0202	0.2619	0.1700	0.0919	
HDAC11	1.0106	0.0351	0.4513	0.5403	-0.0891	GTPase activity						
ESRP2	1.0565	0.0351	0.0653	0.1182	-0.0529	ARHGEP4	2.2445	0.0225	0.8362	0.7829	0.0533	
ZNF574	1.5394	0.0316	0.0697	0.0956	-0.0260	ARHGAP9	1.3184	0.0323	0.8895	0.8383	0.0512	
FERD3L	1.7409	0.0297	0.0238	0.0345	-0.0107	ARAP1	2.5339	0.0202	0.0680	0.0501	0.0179	
Ion homeostasis												
SUSD1	1.8844	0.0275	0.1292	0.2238	-0.0946	Nucleotide/lipid/protein binding	CHD1L	1.3281	0.0323	0.3957	0.3081	0.0876
PKD2L1	2.9414	0.0163	0.1742	0.2603	-0.0861	RRP2	1.1472	0.0351	0.9272	0.9070	0.0202	
KCNK17	5.6817	0.0064	0.0557	0.1240	-0.0683	SCAMP1	2.3287	0.0210	0.0344	0.0272	0.0071	
CCR9	1.1190	0.0351	0.8027	0.8656	-0.0630	Other categories						
Cell junction/communication/motility/transport	IGF2AS	3.7873	0.0140	0.1629	-0.1464	EV2B	3.0694	0.0155	0.8296	0.6549	0.1747	
TNS1	3.0290	0.0155	0.3916	0.5053	-0.1137	C10orf81	1.8032	0.0287	0.8347	0.7173	0.1173	
						SRGN	4.4099	0.0110	0.2978	0.1830	0.1148	
						CTS2	1.1066	0.0351	0.7190	0.6367	0.0823	

Continued

gene was the most methylated gene in patients with OA compared with healthy controls.

The biological process associated with the less methylated genes in patients with OA were those related to the inflammatory/defence response ($p=0.019$), as well as those related to the positive regulation of transcription activity ($p=0.011$); on the other hand, the altered processes related to genes with increased methylation levels in patients with OA were those involved in the regulation of phosphorylation ($p=0.006$) and mitogen-activated protein kinase activity ($p=0.004$).

The unsupervised clustering resulting from the 23 837 selected probes showed three different clusters of samples (see online supplementary figure S3b): cluster 1 consisted of 14 patients with OA and six healthy controls, cluster 2 consisted of two patients with OA and 11 healthy controls, and cluster 3 was formed by seven patients with OA and one healthy control. This technique showed cluster 3 to be a particularly tight cluster of patients with a characteristic DNA methylation profile.

We again performed unsupervised clustering with the selected probes including only the 23 patients with OA. The results showed the same cluster of patients as cluster 3 above, which could be distinguished from the rest of the patients (see online supplementary figure S3c). We therefore based our subsequent analyses on cluster membership from the above clustering method that identified a different subgroup of OA.

Identification and characterisation of OA subgroups

When we compared the DM probes of patients in cluster 3 with the rest of the patients, we identified a total of 1357 significant probes (see online supplementary table S2) that separated the two subgroups of patients (figure 1A). Of these, 306 were less methylated in samples from cluster 3, and 1051 appeared more methylated in this group of samples. Of the less methylated genes in cluster 3, RUNX1, RUNX2 and genes related to

inflammatory response were notable, whereas some genes related to the synthesis of collagens, such as collagen XV α -1 (COL15A1), collagen XVI α -1 (COL16A1), collagen III α -1 (COL3A1), collagen IX α -1 (COL9A1), collagen VI α -3 (COL6A3), procollagen C-endopeptidase enhancer (PCOLCE), collagen XVIII α -3 (COL18A1), collagen XI α -1 (COL11A1) and collagen XXI α -1 (COL21A1), and other cartilage and extracellular matrix-related genes, such as cartilage intermediate layer protein, GDF5, extracellular matrix-2 (ECM2) and chondroitin sulfate proteoglycan-4 (CSPG4), showed significantly increased methylation in this subgroup of patients.

Most of the methylated genes in patients in cluster 3 corresponded to the extracellular region ($p<0.0001$), including the extracellular matrix ($p<0.0001$); the altered molecular functions were those related to extracellular matrix structural constituent ($p=0.05$), polysaccharide binding ($p=0.008$), glycosaminoglycan binding ($p=0.009$) and heparin binding ($p=0.011$) (figure 1B). With regard to the less methylated genes (figure 1C), the altered molecular functions were those related to chemokine activity ($p=0.005$) and cytokine activity ($p=0.018$), and the biological processes were those related to the regulation of cytokine production ($p=0.002$), regulation of inflammatory response ($p=0.014$), leucocyte activation ($p<0.0001$), inflammatory response ($p<0.0001$) and defence response ($p<0.0001$).

Identification of the subgroups of OA by genome-wide expression analysis

To identify the subgroup of patients with OA revealed by the genome-wide DNA methylation approach, we performed a genome-wide expression assay in an independent cohort of 24 OA samples. In the first step, we analysed the microarray data obtained (23 OA samples and 7742 probes retained after array normalisation and non-specific filtering) using PCA as the

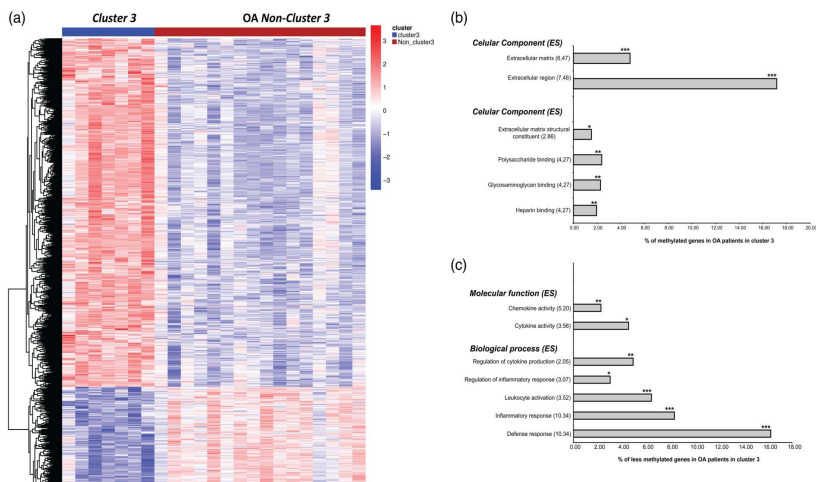
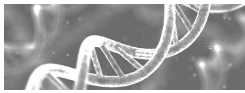


Figure 1 Hierarchical analysis and potentially altered biological process gene ontology (GO) of the differentially methylated probes in patients with osteoarthritis (OA) in cluster 3 and non-cluster 3 patients. (A) Heatmap showing the 1357 differentially methylated probes in patients with OA in cluster 3 and non-cluster 3 patients; (B) GO analysis comparing the methylated genes in patients with OA in cluster 3 and non-cluster 3 patients; (C) GO analysis comparing the less methylated genes in patients with OA in cluster 3 and non-cluster 3 patients. ES, enrichment score. *** $p<0.0001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ with false discovery rate correction for multiple testing.



Clinical and epidemiological research

unsupervised clustering method. This approach separated the OA population into two subgroups: a highly homogeneous group (named cluster A) and a heterogeneous group of six patients (named cluster B) (figure 2).

Analysis of differentially expressed genes in the two subgroups of patients with OA

We created two groups of OA samples according to the clusters identified by the PCA method. When patients were grouped according to this distribution (cluster A versus cluster B), a total of 450 probes were found to be differentially expressed between the two groups (see online supplementary table S3). Of these, 262 were upregulated in patients in cluster B, and 188 were downregulated in this cluster. Heatmap representation showed the differentiation between the two groups of patients (figure 3A).

Most of the upregulated genes in patients in cluster B belonged to the plasma membrane ($p < 0.0001$), and the biological processes related to the less methylated genes in the patients in cluster 3, such as defence response ($p < 0.0001$), inflammatory response ($p < 0.0001$), leucocyte activation ($p < 0.0001$), regulation of cytokine production ($p = 0.0045$) and chemokine activity ($p = 0.0028$), were significantly over-represented in this group of patients also. In addition, increased representation of superoxide anion generation ($p = 0.0206$) and increased synthesis of unsaturated fatty acids ($p = 0.0349$) were detected (figure 3B).

Comparative analysis and validation of the results by quantitative reverse transcriptase (qRT)-PCR

The expression pattern detected in patients in cluster B seems to indicate that this group of patients is closely related to those identified according to the methylation pattern in patients in cluster 3, showing this subgroup of patients to be a tight group characterised by an increased inflammatory response which could be modulated epigenetically leading to reduced synthesis of extracellular matrix constituents (figures 1 and 3).

With regard to the above, we identified 47 significantly altered genes that showed an inverse relationship between the

two approaches (table 2). Of these, 15 were methylated in patients in cluster 3 and also downregulated in patients in cluster B; meanwhile, 32 were less methylated in patients in cluster 3 and also upregulated in patients in cluster B, representing 10.4% (47/450) correlated genes.

We selected for validation, in an independent cohort of 48 patients, a total of eight (less methylated and upregulated) genes concentrating on their increased B-statistic value in both assays: lysosomal protein transmembrane-5 (LAPTMS), T-cell specific surface glycoprotein CD28 (CD28), Fc fragment of IgG low affinity IIb receptor CD32 (FCGR2B), integrin alpha M (ITGAM), pleckstrin (PLEK), lymphocyte cytosolic protein 2 (LCP2), guanine nucleotide-binding protein (G protein) $\alpha 15$ (GNA15) and kynureninase (KYNU). We also included lymphocyte antigen 96 (LY96) for analysis because of its high expression and low methylation levels in some patients in cluster B and cluster 3, respectively.

As expected, not all the samples amplified all the selected genes, with only six of the 44 samples showing amplification for all genes (see online supplementary table S4). On the basis of the expression of these genes in the 44 samples, the hierarchical clustering performed revealed the existence of a cluster of 15 patients, who were different from the remaining 29 (figure 4A), as observed in both methylation (cluster 3) and expression (cluster B) assays. The six samples that amplified the nine selected genes were also included in this cluster. A comparison of the expression levels of the selected genes in these 15 patients and the remaining 29 showed significant differences between the two subgroups, with most of the genes being upregulated in the first subgroup (figure 4B). The most significant differences in gene expression between the two groups corresponded to LAPTMS, ITGAM and PLEK genes, but LY96 and KYNU also showed significantly increased expression.

DISCUSSION

We analysed, for the first time in articular cartilage, the genome-wide DNA methylation profiles of a cohort of 25 patients with OA and 20 healthy controls. Furthermore, because of the subgroup of patients detected by this assay, we tried to identify this cluster of patients by a genome-wide expression approach in a population of 24 patients with OA. Finally, we validated the most consistent common genes resulting from the above assays by qRT-PCR in an independent cohort of 48 patients with OA.

The comparison of the methylation patterns of patients with OA and healthy controls showed 91 DM probes, with RUNX1 being the most DM and least methylated gene in OA. The RUNX1 gene is a critical transcription factor during embryogenesis which is thought to be involved in the development of normal haematopoiesis, neoplastic disease²⁷ and chondrogenesis²⁸ and has also been related to cell death,²⁹ which is also a characteristic of OA.^{28 30–32} Contradictory results with regard to the expression of this gene in OA have been described.^{33 34} In contrast, MSX1 was the most methylated gene in OA; this gene is a member of the MSX family, is associated with bone formation, and has been found to be increased in patients with OA compared with healthy controls in a genome-wide expression study.³³ As none of these genes have previously been shown to be epigenetically modulated in OA, they can be considered to be novel DM loci in this pathology.

In summary, the biological processes associated with the whole set of 91 DM probes in patients with OA and healthy controls are mainly related to the inflammatory/defence response (demethylated), indicating not only that inflammation is a key process in OA,³⁵ but also that it may be regulated by epigenetics.

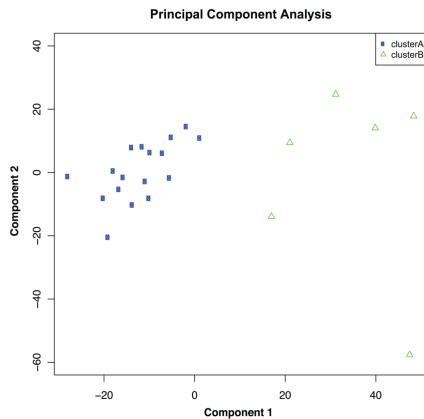
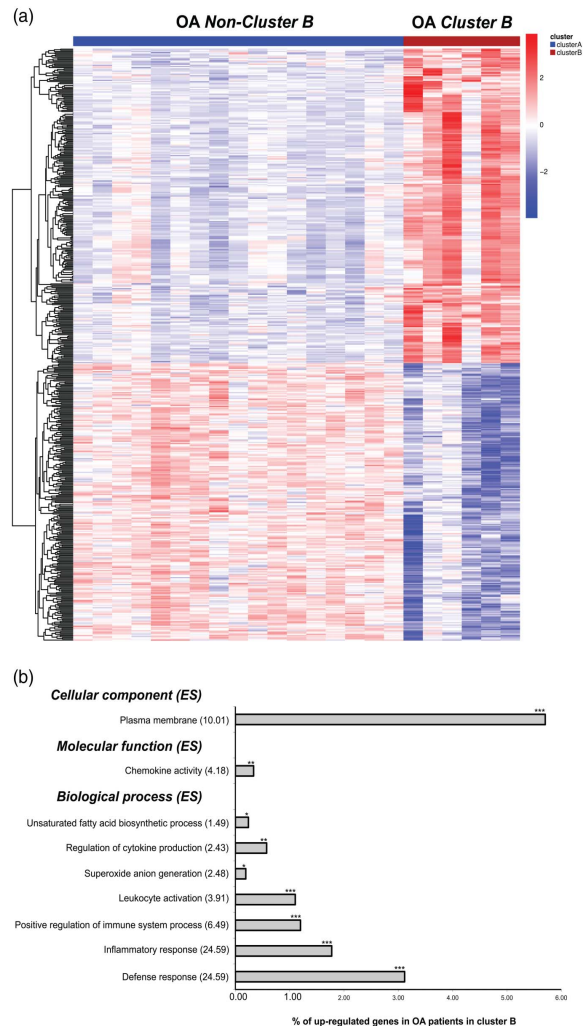


Figure 2 Principal component analysis (PCA) of osteoarthritis (OA) samples using the 7742 probes selected from expression data after initial non-specific filtering. The PCA clearly shows the distribution of the two OA subgroups (cluster A and cluster B).

Figure 3 Hierarchical analysis and potentially altered biological process gene ontology (GO) of the differentially expressed probes in patients with osteoarthritis (OA) in cluster B and non-cluster B patients. (A) Heatmap showing the 450 differentially expressed probes in patients in cluster B and non-cluster B patients; (B) GO analysis comparing the upregulated genes in patients in cluster B with non-cluster B patients. ES, enrichment score. *** $p \leq 0.0001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ with false discovery rate correction for multiple testing.



An important finding of this work is the existence of two OA subgroups (clusters) as a result of the unsupervised clustering carried out in the whole samples. This approach is usually used in methylation/expression studies when it is suspected that different subsets of clinical samples might occur.^{36–38} On this basis, samples belonging to cluster 3 are characterised by decreased synthesis of extracellular matrix constituents and increased inflammatory response. Interestingly, in addition to a wide range of types of collagens and extracellular matrix-related genes, in this group of patients we found a greater degree of methylation in the GDF5 gene, as described previously,²⁰ as well as a marked decrease in methylation of the RUNX2 gene.

The RUNX2 gene is a transcription factor involved in osteoblastic differentiation and skeletal morphogenesis, and increased expression has been found in OA cartilage.^{35–39}

Previous studies have shown epigenetic (demethylation) regulation of some of the cartilage-degrading enzymes, such as MMP-3, MMP-9, MMP-13 and ADAMTS-4.^{12–17} However, in the present work we did not find any significant difference between patients with OA and healthy controls, and only a small increase in methylation was detected for both MMP-3 and ADAMTS-14 in patients in cluster 3 compared with non-cluster 3 patients. In order to explain this, it should be stated that: (i) the overall methylation levels of a particular gene may be important

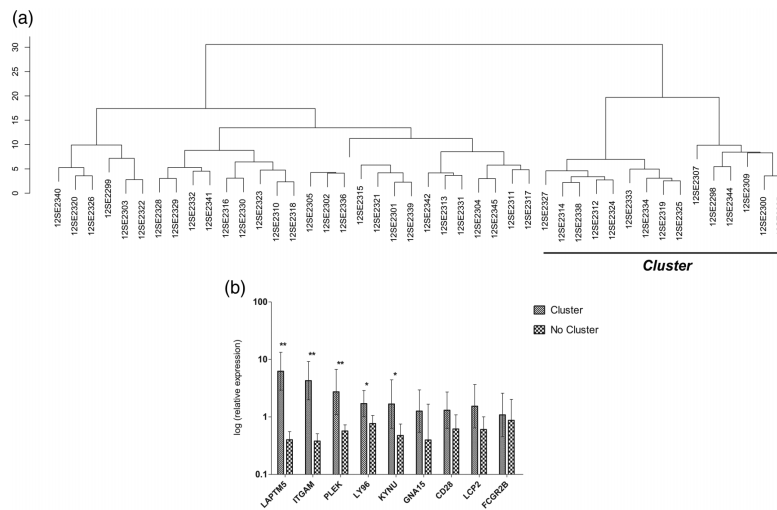


Figure 4 Hierarchical clustering and mean expression levels in the validation cohort of osteoarthritis (OA) samples. (A) Cluster of patients obtained by concentrating on the expression levels of the nine selected genes. (B) Mean expression levels of the nine selected genes in both clusters. Vertical bars indicate 95% CI. ** $p \leq 0.0001$, * $p \leq 0.05$ after Mann-Whitney non-parametric test.

in regulating this gene rather than the methylation status of specific CpG dinucleotides,²⁰ whereby it is possible that the CpG loci analysed by the above authors are not included in the Infinium HumanMethylation27 beadchip; (ii) these cartilage-degrading enzymes are mainly (modestly) expressed by chondrocytes in the superficial zones of the OA cartilage,^{40–41} and, as we extracted the DNA from the whole (normal and OA) cartilage, this discrepancy would not be unexpected; (iii) the data related to mRNA expression for MMP-3 found in the literature are very contradictory¹²; and (iv) despite global DNA methylation levels decreasing with age,^{42–44} a reduction in DNA methylation is technically more difficult to detect.¹⁶

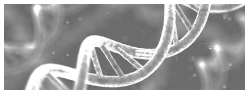
To identify this tight cluster of patients and validate the results of the methylation assay, we performed a genome-wide expression analysis in an independent cohort of patients, which also revealed the existence of a tight cluster of patients (cluster B). Moreover, a large coincidence was detected between the most significant biological processes related to the less methylated genes in the patients in cluster 3 and the most significant biological processes related to the upregulated genes in cluster B. Therefore, an increased number of genes related to cytokine production and inflammatory/defence response were significantly altered in this subgroup of patients. With regard to this, this subgroup of patients was also characterised by an increased inflammatory response. As the group of patients that comprise cluster B are characterised by increased body mass index (personal data), this may be related to systemic factors induced by obesity (eg, adipokines, increased synthesis of fatty acids) and/or the increased oxidative stress detected in this subgroup of patients (see figure 3B), as previously proposed.^{45–46}

Despite the use of three independent groups of samples for each of the approaches performed in this work, a marked and common finding is the identification of a tight subgroup of patients with all of the assays performed. We can therefore rule

out the possibility that this cluster is based on features other than the pathogenesis of the disease itself, such as age or gender. All the models were adjusted for age, and the mean age for the samples that comprise the different clusters is very similar; moreover, despite the higher frequency of women in all groups, no difference in gender distribution was detected between clusters (see online supplementary table S1).

In addition, an inverse relationship between methylation and expression was detected for 47 genes (10.4%), and the validation by qRT-PCR of some of the genes showing the most consistent relationship was able to identify this tight cluster of patients, indicating not only significant differences between the two groups, but also candidate genes that could be used as new therapeutic markers for OA such as PLEK, LAPTM5, ITGAM, Y96 and KYNU.

In summary, as OA can be considered the final common pathway of joint destruction for multiple different pathophysiological aetiologies which define the existence of different phenotypes of OA,⁴⁷ the identification and isolation of these phenotypes (or subgroups) may be critical for the development of effective treatment and disease prevention.⁴⁷ In this regard, this work shows not only that patients and healthy controls have different methylation patterns, but also the existence of a tight cluster of patients, corroborated by a genome-wide expression assay. Both approaches reveal a higher-than-usual inflammatory response significantly represented in this subgroup of patients; this condition may be caused by increased oxidative stress and fatty acid synthesis, leading to decreased synthesis of extracellular matrix constituents. By using some of the genes with a consistent correlation between methylation and expression, we were able to identify novel genes in a subgroup of patients that may emerge as new therapeutic candidate markers of OA disease. However, as methylation is a dynamic process prone to changes in the environment (disease) and as the



Clinical and epidemiological research

age-related loss of normal epigenetic patterns is a possible mechanism for the late onset of common human diseases (such as OA), further studies of, for example, dimethyltransferases need to be performed to ascertain if changes in DNA methylation patterns play a major role in OA pathogenesis or, on the contrary, these changes are a result of altered OA chondrocytes or even a combination of both scenarios.

Acknowledgements We would like to express our appreciation of Lourdes Sanjurjo and Maria Dolores Velaondo of the Department of Orthopaedic Surgery of CHU A Coruna. This study was supported by grants from Fundacion Española de Reumatología (programa GEN-SER) and from Fondo Investigación Sanitaria (CIBER/CB06/01/0040)-Spain, Fondo Investigación Sanitaria-PI 08/2028, Ministerio Ciencia e Innovación PLE2009-0144, with a contribution of funds from FEDER (European Community). IR-P was supported by Contrato de Apoyo a la Investigación-Fondo Investigación Sanitaria (CA10I01564). MEV-M was supported by a grant from Programa Rio Hortega (Fondo de Investigación Sanitaria). Methylation assay services were provided by the Spanish 'Centro Nacional de Genotipado (CEGEN-ISCIH)' (<http://www.cegen.org>).

Contributors JF-T performed data filtering, normalisation and analysis of methylation data. He also participated in gene expression profiling and gene expression data analysis, as well as the gene ontology analyses. He helped to draft the manuscript and has given final approval of the version to be published. EC-P and MF-M were involved in nucleic acid (DNA and RNA) isolation and reverse transcription. JLF and AM carried out DNA methylation profiling. AS-H and MEV-M carried out gene validation. NO and CF-L collected the samples and checked clinical histories for the inclusion and exclusion criteria. Both collected and analysed the radiographic information of the samples. IR-P was involved in the conception and design of the study; he helped to draft the manuscript and has given final approval of the version to be published. He was also involved in the bioinformatics analysis of the results. FJB conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Ethics approval Clinical ethics committee of Galicia-Spain.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Dieppe PA, Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 2005;365:965–73.
- Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998;41:1343–55.
- Valdes AM, Doherty S, Muir KR, et al. Genetic contribution to radiographic severity in osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1537–40.
- Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:161–9.
- Roach HI, Aigner T. DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:128–37.
- Barter MJ, Bui C, Young DA. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:339–49.
- Golding MB, Marcu KB. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med* 2012;18:109–18.
- Reynard LN, Loughlin J. Genetics and epigenetics of osteoarthritis. *Maturitas* 2012;71:200–4.
- Liu L, Li Y, Tollfellsbol TO. Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Curr Issues Mol Biol* 2008;10:25–36.
- Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:490–5.
- Forsyth CB, Cole A, Murphy G, et al. Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;60:1118–24.
- Roach HI, Yamada N, Cheung KS, et al. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum* 2005;52:3110–24.
- Iliopoulos D, Malizos KN, Tsezou A. Epigenetic regulation of leptin affects MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis therapeutic intervention. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1616–21.
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010;70:27–56.
- Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011;17:330–9.
- Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012;13:679–92.
- Cheung KS, Hashimoto K, Yamada N, et al. Expression of ADAMTS-4 by chondrocytes in the surface zone of human osteoarthritic cartilage is regulated by epigenetic DNA de-methylation. *Rheumatol Int* 2009;29:525–34.
- Hashimoto K, Dreffe RO, Gibson MB, et al. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2009;60:3303–13.
- Imagawa K, de Andrés MC, Hashimoto K, et al. The epigenetic effect of glucosamine and a nuclear factor-kappa B (NF-kB) inhibitor on primary human chondrocytes—implications for osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;405:362–7.
- Reynard LN, Bui C, Canty-Laird EG, et al. Expression of the osteoarthritis-associated gene GDF5 is modulated epigenetically by DNA methylation. *Hum Mol Genet* 2011;20:3450–60.
- Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, et al. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:172–89.
- Scott JL, Gabrieldes C, Davidson RK, et al. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1502–10.
- Sesselmann S, Söder S, Voigt R, et al. DNA methylation is not responsible for p21WAF1/CIP1 down-regulation in osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:507–12.
- Delgado-Calle J, Fernández AF, Sainz J, et al. Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65:197–205.
- Monti S, Tamayo P, Mesirov J, et al. Consensus clustering: a resampling-based method for class discovery and visualization of gene expression microarray data. In: Kluwer Academic Publishers ed. The Netherlands: Machine Learning, 2003:91–118.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44–57.
- Boypapati A, Ren B, Zhang DE. SERPINB13 is a novel RUNX1 target gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;411:115–20.
- Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science* 2012;336:717–21.
- Inoue K, Ito Y. Neuroblastoma cell proliferation is sensitive to changes in levels of RUNX1 and RUNX3 protein. *Gene* 2011;487:151–5.
- Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, et al. Osteoarthritic chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998;41:284–9.
- Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets* 2007;8:333–45.
- Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:791–801.
- Karlsson C, Dehne T, Lindahl A, et al. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:581–92.
- Yano F, Hojo H, Ohba S, et al. A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. *Ann Rheum Dis* 2012. Published Online First 5 Oct 2012.
- Golding MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:471–8.
- Van der Auwera I, Yu W, Suo L, et al. Array-based DNA methylation profiling for breast cancer subtype discrimination. *PLoS One* 2010;5: e12616.
- Hinoue T, Weisenberger DJ, Lange CP, et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res* 2012;22:271–82.
- Marsit CJ, Koestler DC, Christensen BC, et al. DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1133–9.
- Wang X, Manner PA, Homer A, et al. Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:963–73.
- Bau B, Gebhard PM, Haag J, et al. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* 2002;46:2648–57.
- Aigner T, Zien A, Hanisch D, et al. Gene expression in chondrocytes assessed with use of microarrays. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(Suppl 2):117–23.
- Wilson VL, Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 1983;220:1055–7.
- Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet* 2004;68(Pt 3):196–204.
- Björnsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, et al. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA* 2008;299:2877–83.
- Gierman LM, van der Ham F, Koudijs A, et al. Metabolic stress-induced inflammation plays a major role in the development of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2012;64:1172–81.
- Zhuo Q, Yang W, Chen J, et al. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:729–37.
- Felson DT. Identifying different osteoarthritic phenotypes through epidemiology. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:601–4.