

## Nueva propuesta metodológica para la estimación de la eficiencia energética de la Cadena de Transporte de Electrones mitocondrial en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

*New methodology approach to estimate the energetic efficiency of the Mitochondrial Electron Transport Chain in CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes*

Laura Valverde, Xabier Elcoroaristizabal, Alejandra Álvarez, Sergio Cardoso, Marian M. de Pancorbo

BIOMICs Research Group, Centro de Investigación CIEA “Lucio Lascaray”, Universidad del País Vasco, España.

**Autor de correspondencia:** Prof. Marian Martínez de Pancorbo. [marian.mdepancorbo@ehu.es](mailto:marian.mdepancorbo@ehu.es)

**Palabras clave:** eficiencia energética, cadena de transporte de electrones, CTE, mitocondria, CD4<sup>+</sup>

**Keywords:** energetic efficiency, electron transport chain, ETC, mitochondria, CD4<sup>+</sup>

### Resumen

Los diferentes polimorfismos del ADN mitocondrial pueden provocar cambios en la estructura de las proteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones y a su vez modificar el funcionamiento o eficiencia de una de las principales funciones de la mitocondria, la fosforilación oxidativa. Esto ha sido relacionado con numerosas enfermedades.

En este trabajo presentamos un nuevo procedimiento basado en la medida combinada de tres parámetros indicadores del estado energético mitocondrial, el potencial de membrana, la producción de anión superóxido y los niveles de ATP. La evaluación conjunta de estos parámetros permite inferir la funcionalidad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y por tanto, son buenos indicadores de la eficiencia energética de la misma.

Se han realizado ensayos de reproducibilidad en las medidas de estos tres parámetros *in vivo* y en cultivo, concluyendo que las medidas en cultivo muestran una reproducibilidad mucho más adecuada para llevar a cabo estimas de eficiencia energética. Además, la posibilidad de un control riguroso de los factores exógenos bajo cultivo permite estimar también los cambios en el metabolismo mitocondrial tras el sometimiento de un cultivo a condiciones como respuesta a fármacos, escasez de alimentos,... Así, esta metodología permite realizar un ensayo individualizado de la eficiencia del metabolismo energético mitocondrial, cuya importancia está en constante aumento por su implicación en numerosos estados patógenos.

## Abstract

The different DNA mitochondrial polymorphisms can generate changes in the structure of the proteins involved in the mitochondrial Electron Transport Chain, and therefore modify the functionality or efficiency of one of the principal functions of the mitochondria, the oxidative phosphorylation. This has been related with several diseases.

In this study we present a new methodology to estimate the mitochondrial energetic efficiency based on the combined measurement of three indicators of the energetic state in the mitochondria: the membrane potential, the production of reactive oxygen species and the ATP levels.

The assays based on these three indicators performed both *in vivo* and in cell culture concluded that the reproducibility in cell culture was higher and thus more suitable to carry out estimates of energetic efficiency. Furthermore, cell cultures allow a strict control over the external conditions, allowing the comparison of different individuals under controlled identical conditions and their responses to changes in their environment, as drugs addition, food scarcity, sudden temperature changes,... Thereby, this methodology allows individualized assays of the mitochondrial energetic efficiency, which is of great importance since energetic metabolism deficiencies are involved in several pathogen states.

## Introducción

La principal función de las mitocondrias es proveer a las células de la mayoría del ATP que necesitan, mediante el proceso de fosforilación oxidativa llevado a cabo en la cadena de transporte de electrones (CTE) de la membrana mitocondrial interna. Las proteínas implicadas en este proceso de fosforilación oxidativa son codificadas tanto por el genoma nuclear como por el mitocondrial.

Durante los últimos años varios estudios han argumentado que la existencia de polimorfismos en los genes que codifican estas proteínas, especialmente los situados en el genoma mitocondrial, pueden ser responsables de leves variaciones con gran repercusión en la eficiencia energética mitocondrial. Las diferencias en el funcionamiento de la CTE han sido relacionadas con enfermedades neurodegenerativas (van der Walt *et al.*, 2003; Martínez-Redondo *et al.*, 2010), la penetrancia de algunas enfermedades (Brown, 1997; DiMauro and Schon, 2003; SanGiovanni *et al.*, 2009), la movilidad de los espermatozoides (Moore *et al.*, 2000, Ruiz-Pesini *et al.*, 2000; Montial-Sosa *et al.*, 2006) y también con la longevidad de diferentes poblaciones (Ivanova *et al.*, 1998; De Benedictis *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 2001; Niemi *et al.*, 2003; Cacabelos *et al.*, 2005; Santoro *et al.*, 2006; Beckstead *et al.*, 2009; Marcuello *et al.*, 2009).

La mitocondria lleva a cabo un importante papel de mantenimiento de la homeostasis celular en varios órganos del cuerpo por lo que el desarrollo de métodos de medida del estado metabólico y energético mitocondrial ha sido propuesto incluso como herramienta farmacogenética (Mayevsky and Barbiro-Michaely, 2009; Gómez-Durán *et al.*, 2010).

En este trabajo presentamos un procedimiento sencillo y eficaz para estimar la eficiencia energética mitocondrial a partir de las medidas combinadas del potencial de la membrana mitocondrial, la producción de anión superóxido y los niveles de ATP.

El potencial de membrana (MP) se genera por el bombeo de protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana de la mitocondria gracias a la energía liberada del transporte electrónico en la CTE. El gradiente electroquímico generado por el bombeo de protones permite que el flujo de entrada de protones a favor de gradiente sea utilizado por la enzima ATP sintasa para generar ATP o para el transporte de diversos sustratos al interior de la mitocondria.

La situación más eficiente desde un punto de vista energético tiene lugar cuando hay acoplamiento quimiosmótico, donde toda energía del gradiente electroquímico se utiliza únicamente para generar ATP y no hay liberación de calor. La cantidad de ATP producido en la mitocondria por fosforilación oxidativa depende del porcentaje del gradiente electroquímico que se utilice para otros fines diferentes a la síntesis de ATP. Normalmente más de un 40% de esta

energía electroquímica es convertida en enlaces fosfato de ATP. La energía no utilizada se libera en forma de calor (Brookes 2005).

Los aniones superóxido se generan como un subproducto de la fosforilación oxidativa. Un pequeño porcentaje del oxígeno utilizado por la CTE queda reducido de manera incompleta y reacciona con el oxígeno molecular generando esta especie reactiva de oxígeno (ROS). Los excesos de producción de anión superóxido han sido relacionados con enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento prematuro y con el cáncer (Wallace 2005).

Por todo lo anterior, la utilización de estos tres parámetros, MP, ROS y ATP, es muy apropiada para realizar una estimación minuciosa del estado energético de la mitocondria.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un procedimiento basado en la medida combinada de estos tres parámetros para la detección de la eficiencia energética de la CTE, cuyas principales aplicaciones son realizar comparaciones entre el estado energético de la misma población celular entre individuos diferentes, o de la misma población celular en situaciones diferentes.

La comprobación de la efectividad y sensibilidad de dichos parámetros para la detección de la eficiencia energética de la CTE se llevó a cabo en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica. Se seleccionó este tipo celular por su abundancia y facilidad de obtención. La evaluación se llevó a cabo tanto en condiciones normales como tras la aplicación de un shock térmico.

Los resultados mostraron que el ensayo mostraba mayor reproducibilidad cuando los linfocitos T CD4<sup>+</sup> eran puestos en cultivo en vez de realizar las medidas directamente *in vivo*, presumiblemente debido a un mayor control de los factores exógenos en cultivo, lo que dotó a los resultados de mayor fiabilidad.

## **Material y métodos**

### ***Extracción de sangre***

Las muestras de sangre periférica fueron extraídas a voluntarios sanos en tubos con anticoagulante EDTA. Los voluntarios fueron informados de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento.

### ***Separación magnética de linfocitos T CD4<sup>+</sup>***

Este procedimiento debe realizarse dentro de las 48 horas posteriores a la extracción de la sangre periférica para asegurar buen rendimiento. Se centrifugó 1 ml de sangre periférica de cada individuo a 1500 g durante 15 minutos para recuperar una fracción enriquecida en células blancas. Posteriormente se realizó la lisis eritrocitaria mediante incubación con 1 ml de la solución RBC Lysis del kit Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) durante 15 minutos de incubación, a continuación se centrifugó a 850 g durante 10 minutos y se repitió el proceso. La fracción celular resultante de la segunda lisis fue resuspendida en 500 µl de PBS y se procedió inmediatamente al aislamiento de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante el kit de extracción magnético Dynabeads Flow Comp Human CD4 (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### ***Cultivos celulares de linfocitos T CD4<sup>+</sup>***

Los linfocitos CD4 ya aislados, fueron centrifugados a 350 g 5 minutos para retirar los restos del buffer de extracción utilizado y ser resuspendidos y puestos de manera inmediata en un medio de cultivo adecuado. El medio de cultivo empleado fue RPMI suplementado con Suero Bovino Fetal al 10%, Ampicilina (10 µl/ml), Estreptomicina-Penicilina (100 µl/ml), L-Glutamina 2mM (10 µl/ml) y fitohematoglutina (10 µl/ml). Los linfocitos se pusieron a crecer en 1 ml de este medio de cultivo en una estufa a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***Estimación de la viabilidad celular***

El conteo de número de células y estimaciones de viabilidad celular se realizaron con un equipo automático TC10 (BioRad) a las 18 horas de cultivo así como previamente a cada medida. La viabilidad fue detectada mediante tinción con azul tripán (TC10 trypan blue dye, BioRad). Todas las medidas se realizaron por triplicado.

### ***Medida del potencial de membrana (MP) y de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)***

La estimación del potencial de la membrana interna mitocondrial se realizó utilizando el kit *MitoStep* (Immunostep, Salamanca, Spain) que incluye la sonda catiónica DiIC1(5).

La producción de anión superóxido en la mitocondria se midió mediante el kit *MitoSOX Red* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Se mezclaron 50  $\mu$ l de cada cultivo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> con 0,5  $\mu$ l de la sonda DiIC1(5) y 50  $\mu$ l de solución *MitoSOX Red* 5 $\mu$ M. Se incubó en oscuridad 10 minutos a 37°C 5% CO<sub>2</sub> y se procedió a la medida de la fluorescencia intracelular producida por ambas sondas en un lector DTX880 (Beckman Coulter), en primer lugar la fluorescencia derivada del *MitoSOX* empleando los filtros 510/580 e inmediatamente después la fluorescencia derivada de la sonda DiIC1(5) con los filtros 633/658. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

### ***Determinación de los niveles de ATP***

Los niveles de ATP se midieron utilizando el *ATP Determination Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Previamente los linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron lisados mediante incubación a 95°C 15 minutos cada cultivo celular con un volumen igual de H<sub>2</sub>O MQ estéril. Los lisados se mezclaron con los reactivos luciferina/luciferasa proporcionados por el kit y la luminiscencia producida fue inmediatamente medida en el lector DTX880 (Beckman Coulter). La recta patrón utilizada cubrió el rango entre 1  $\mu$ M y 1,9 nM de ATP en 10 diluciones de una muestra control de ATP de concentración conocida.

### ***Ensayos in vivo: citometría de flujo***

Se realizó una tinción directa en sangre periférica (previa lisis de eritrocitos) de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> con los anticuerpos monoclonales CD4 CF Blue (Immunostep, Salamanca, Spain), conjuntamente con los reactivos de los kits de medida de MP y ROS. Cada valor de fluorescencia fue detectado mediante los filtros recomendados por los fabricantes.

### ***Análisis de los resultados***

Todos los valores obtenidos en las medidas de MP, ROS y ATP fueron normalizados en base al número de células vivas para hacer posible su intercomparación.

Los valores de fluorescencia normalizados fueron representados de manera conjunta en gráficos Microsoft Excel para su interpretación.

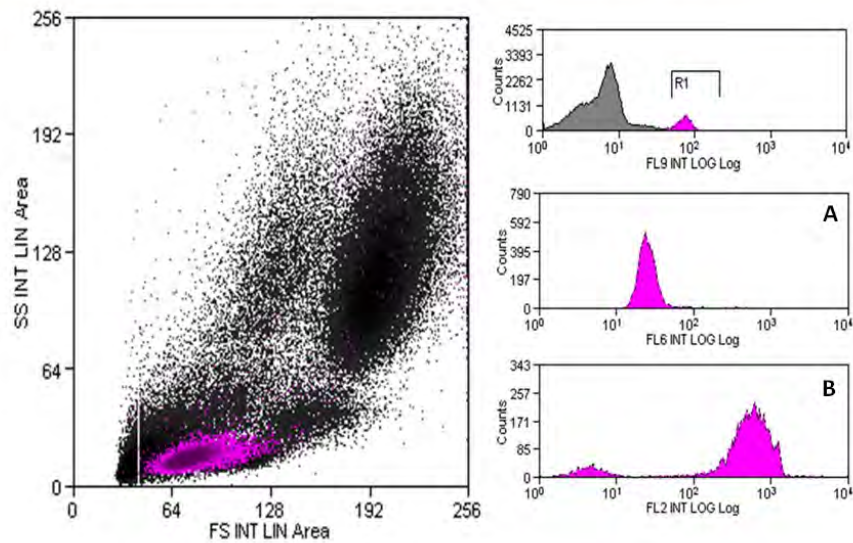
## **Resultados y discusión**

Este trabajo presenta una metodología sencilla, rápida y coste-eficaz para estimar la eficiencia energética de la CTE mitocondrial mediante la determinación y valoración conjunta de tres parámetros: el potencial de membrana (MP), la producción de radicales superóxido (ROS) y los niveles de ATP.

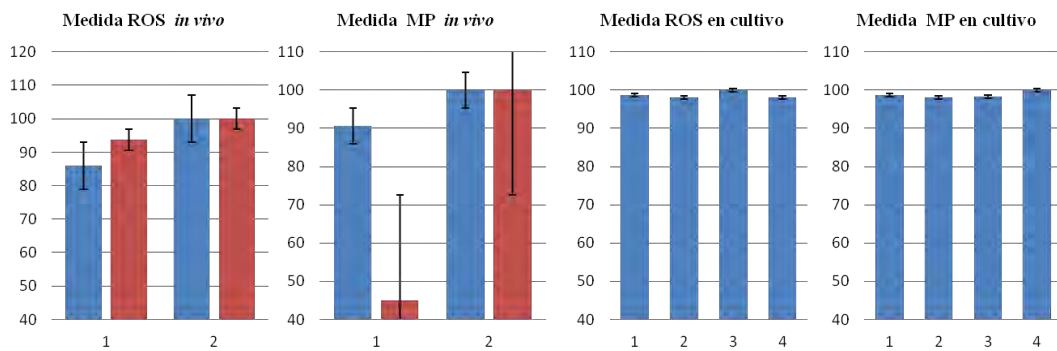
Durante el desarrollo de esta metodología se valoraron diferentes técnicas de medida tanto *in vivo* como en cultivo.

Las estimaciones *in vivo* se realizaron mediante citometría de flujo, para lo cual se realizó una tinción directa en sangre periférica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> conjuntamente con los reactivos de los kits de medida de MP y ROS (Figura 1).

La medida de fluorescencia *in vivo* tiene las ventajas de poder realizar estimas de varios parámetros de manera simultánea, lo que minimiza las variaciones que pudieran surgir entre una medida y la siguiente, además de controlar con exactitud el número de células objeto de las medidas. Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron suficiente reproducibilidad. Se tuvo en cuenta la posible influencia de condiciones ambientales tales como la ingesta de alimento o el ejercicio físico previos a la extracción de sangre, así como el tiempo transcurrido entre la extracción y la realización de las medidas. Para realizar una estima de la reproducibilidad se compararon los resultados obtenidos de dos partes alícuotas de una misma muestra de sangre normalizados en base al número de células, y en dos individuos. Los resultados mostraron poca reproducibilidad en las medidas realizadas 5 horas después de la extracción de sangre (Figura 2).



**Figura 1.** Ensayo *in vivo* mediante citometría de flujo. La fracción sanguínea correspondiente a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (fracción R1) se muestra resaltada en color magenta. A) Fluorescencia correspondiente a MP (filtro 6) y B) Fluorescencia correspondiente a ROS (filtro 9).  
**Figure 1.** Flow cytometry *in vivo* assay. The population of T CD4<sup>+</sup> lymphocytes is signalled in pink (R1 fraction). A) MP fluorescence (filter 6) and B) ROS fluorescence (filter 9).



**Figura 2.** Medidas de ROS y MP de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y sus errores estándar correspondientes. Los datos *in vivo* se refieren a medidas tomadas 5 horas tras la extracción de sangre periférica de dos individuos diferentes (azul y rojo). La sangre fue dividida en 2 partes alicuotas que se analizaron por separado. Los datos de las medidas *in vitro* se obtuvieron de cuatro cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados de una única extracción de sangre de un solo individuo, tras 24 h en cultivo.  
**Figure 2.** ROS and MP measurements in T CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *In vivo* measurements were done 5 hours after the extraction of peripheral blood from 2 different individuals (blue and red). Blood was divided into two aliquots that were analysed independently. *In vitro* measurements were done in 4 T CD4<sup>+</sup> lymphocyte cultures isolated from a single blood extraction of 1 individual and after 24 hours of growing in culture.

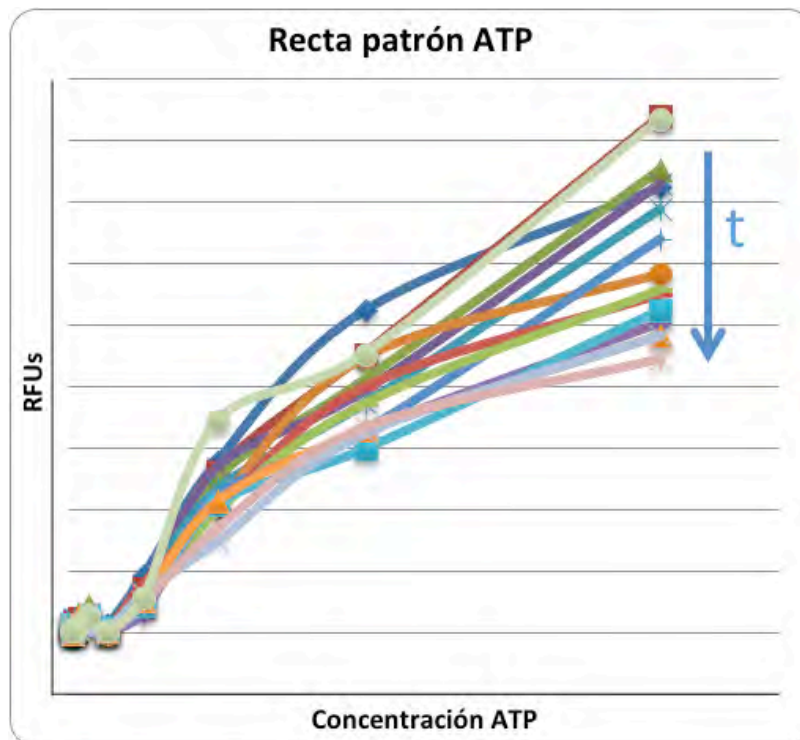
La falta de reproducibilidad observada nos hizo descartar la estima de la eficiencia de la CTE *in vivo*, y con ello evitar la complejidad de someter de manera rigurosa a los donantes a condiciones ambientales similares.

En cambio, los resultados obtenidos de las medidas de fluorescencia de ROS y MP *in vitro*, normalizadas según el número de células, mostraron una gran reproducibilidad (Figura 2). En concreto, se realizaron tres medidas consecutivas (en el gráfico se presenta la media) de 4 cultivos obtenidos a partir de una única extracción de sangre realizada a un individuo. Las medias de cada cultivo no mostraron diferencias significativas entre sí ( $p > 0,05$ ), corroborando la reproducibilidad del método en cultivo.

En cuanto a la evaluación del método y tiempo de medida más adecuados para estimar los niveles de ATP intracelular, se realizaron varios ensayos con concentraciones conocidas de ATP

dirigidos en primer lugar a estimar el mejor método de lisis celular. La adición de detergentes aniónicos suaves como el SDS para la lisis celular mostró interferencias en las medidas de luminiscencia posteriores. Por ello nos decantamos por la adición de un volumen 1:1 de H<sub>2</sub>O MQ esterilizada seguida de un calentamiento durante 5 minutos a 95°C, lo cual no mostró interferencias en las medidas posteriores.

La estimación del momento más adecuado para estimar los niveles de ATP se realizó mediante la comparación los valores de luminiscencia de dilución de la recta patrón de ATP (10 diluciones de una muestra de concentración conocida de ATP, desde 1 μM de ATP hasta 1,9 nM ATP) obtenidos cada 138 segundos (Figura 3). La cinética permitió comprobar que los valores de luminiscencia caían rápidamente con el transcurso del tiempo. Esto indicó la necesidad de realizar las medidas en todos los cultivos con un alto control del tiempo transcurrido tras la adición de la enzima (luciferasa) y sustrato (luciferina), desencadenantes de la reacción luminiscente.



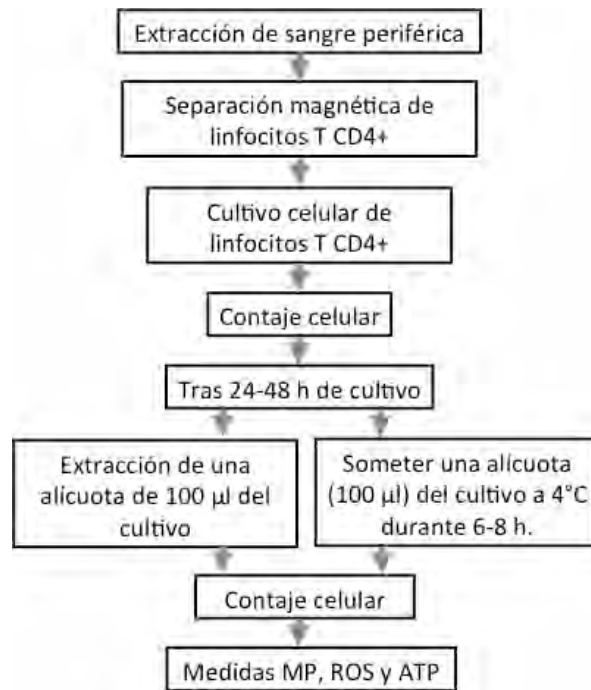
**Figura 3.** Rápida pérdida de luminiscencia con el transcurso del tiempo tras el inicio de la reacción luminiscente luciferasa/luciferina utilizada para estimar los niveles intracelulares de ATP.

**Figure 3.** Loss of intensity in luminescent signal with time since the beginning of the luciferase/luciferine enzymatic reaction used for estimating ATP intracellular levels.

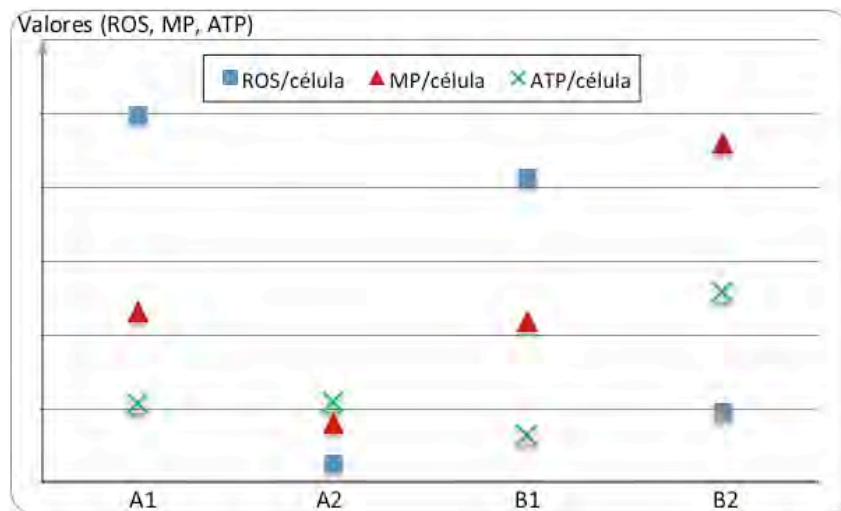
Por tanto, el flujo de trabajo de la metodología propuesta para la estima de la eficiencia energética de la CTE mitocondrial quedaría tal y como se muestra en la figura 4.

La figura 5 muestra un ejemplo de las medidas realizadas a dos individuos sanos (A y B) en condiciones normales a las 24h de cultivo y tras someterlos a un shock por falta de alimentos y bajada de la temperatura. Concretamente, a las 24 horas de cultivo se tomó una alícuota de los mismos y se colocaron durante 6 horas en un medio de cultivo sin suero bovino fetal y a 4°C.

Puede observarse que en condiciones normales ambos cultivos presentan un comportamiento similar para los 3 parámetros (ROS, MP y ATP), aunque el individuo B en niveles algo menores. En cambio, cada individuo reacciona de manera diferente al shock. Mientras el individuo A disminuye sus niveles de MP y ROS, el individuo B muestra disminución de ROS pero un aumento de MP y ATP. El aumento de MP puede estar relacionado con la necesidad de bombear más protones al espacio intermembrana para incrementar el gradiente electroquímico no sólo para generar más ATP, sino para activar el metabolismo de las grasas y generar más calor en respuesta al shock frío (Mishmar *et al.*,2003; Brookes 2005).



**Figura 4.** Metodología para estimar la eficiencia de la CTE mitocondrial.  
**Figure 4.** Workflow to estimate the efficiency of the mitochondrial Electron Transport Chain.



**Figura 5.** Comportamiento de los cultivos A y B en condiciones normales (A1, B1) y tras un shock de falta de alimento y frío (A2, B2). Todos los parámetros fueron normalizados en base al número de células vivas.  
**Figure 5.** Behaviour of the cell cultures A and B in normal conditions (A1, B1) and after a shock based in lack of food and cold (A2, B2). All the parameters were normalized in base of the number of life cells.

En conclusión, la eficiencia y reproducibilidad de la técnica propuesta indica que el estudio de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *in vitro* es una forma adecuada para realizar estimas de eficacia de la CTE y además ofrece varias ventajas, siendo la principal la posibilidad de controlar rigurosamente los factores exógenos. Esta técnica también ofrece la posibilidad de realizar estudios individualizados de la eficiencia energética mitocondrial de la CTE, cada día más reconocida como causa de varios estados patológicos (Mayevsky and Barbiro-Michaely, 2009; Gómez-Durán et al., 2010).

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el apoyo técnico y humano de los SGiker (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, FSE), especialmente el de A. Díez. También quieren agradecer la colaboración del Servicio de Citometría del Hospital de Valdecilla, especialmente a E. del Cerro.

## Referencias

- Beckstead, W.A., Ebbert, M.T., Rowe, M.J., McClellan, D.A., 2009, Evolutionary pressure on mitochondrial cytochrome b is consistent with a role of Cytb17T affecting longevity during caloric restriction, *PLoS One*, 4(6), e5836.
- Brookes, P.S., 2005, Mitochondrial H (+) leak and ROS generation: an odd couple, *Free Radic. Biol. Med.*, 38(1), 12-23.
- Brown, G.K., 1997, Bottlenecks and beyond: Mitochondrial DNA segregation in health and disease, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 20 (1), 2-8.
- Cacabelos, R., Fernandez-Novoa, L., Lombardi, V., Kubota, Y., Takeda, M., 2005, Molecular genetics of Alzheimer's disease and aging, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol*, 27 (Suppl A), 1-573.
- De Benedictis, G., Rose, G., Carrieri, G., De Luca, M., Falcone, E., Passarino, G., Bonafe, M., Monti, D., Baggio, G., Bertolini, S., Mari, D., Mattace, R., Franceschi, C., 1999, Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J*, 13 (12), 1532-1536.
- DiMauro, S., Schon, E.A., 2003, Mitochondrial respiratory-chain diseases, *N. Engl. J. Med*, 348 (26), 2656-2668.
- Gómez-Durán, A., Pacheu-Grau, D., López-Gallardo, E., Díez-Sánchez, C., Montoya, J., López-Pérez, M.J., Ruiz-Pesini, E., 2010, Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups, *Hum. Mol. Genet.*, 19 (17), 3343-53.
- Ivanova, R., Lepage, V., Charron, D., Schächter, F., 1998, Mitochondrial genotype associated with French Caucasian centenarians, *Gerontology*, 44 (6), 349.
- Marcuello, A., Martínez-Redondo, D., Dahmani, Y., Casajús, 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.
- 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<sub>2</sub>max consumer--is it a paradox?,
- Mayevsky, A., Barbiro-Michaely E., 2009, Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function *in vivo*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 1977-1988.
- 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.*, 100 (1), 171-6.
- Montiel-Sosa, F., Ruiz-Pesini, E., Enríquez, J.A., Marcuello, A., Díez-Sánchez, C., Montoya, J., Wallace, D.C., López-Pérez, M.J., 2006, Differences of sperm motility in mitochondrial DNA haplogroup U sublineages, *Gene*, 368, 21-27.
- Moore, F.L. y Reijo-Pera, R.A., 2000, Male Sperm Motility Dictated by Mother's mtDNA, *Am. J. Hum. Genet.*, 67, 543-548.
- Niemi, A.K., Hervonen, A., Hurme, M., Karhunen, P.J., Jylhä, M., Majamaa, K., 2003. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum. Genet.*, 112 (1), 29-33.
- Rose, G., Passarino, G., Carrieri, G., Altomare, K., Greco, V., Bertolini, S., Bonafè, M., Franceschi, C., De Benedictis, G., 2001, Paradoxes in longevity: sequence analysis of mtDNA haplogroup J in centenarians, *Eur. J. Hum. Genet*, 9 (9), 701-707.
- Ross, O.A., McCormack, R., Curran, M.D., Duguid, R.A., Barnett, Y.A., Rea, I.M., Middleton, D., 2001, Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population. *Exp. Gerontol*, 36 (7), 1161-1178.



- Ruiz-Pesini, E., Lapena, A.C., Díez-Sánchez, C., Pérez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Díaz, M., Urriés, A., Montoro, L., López-Pérez, M.J., Enríquez, J.A., 2000, Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility, *Am. J. Hum. Genet.*, 67 (3), 682-696.
- SanGiovanni, J.P., Arking, D.E., Iyengar, S.K., Elashoff, M., Clemons, T.E., Reed, G.F., Henning, A.K., Sivakumaran, T.A., Xu, X., DeWan, A., Agrón, E., Rochtchina, E., Sue, C.M., Wang, J.J., Mitchell, P., Hoh, J., Francis, P.J., Klein, M.L., Chew, E.Y., Chakravarti, A., 2009, Mitochondrial DNA variants of respiratory complex I that uniquely characterize haplogroup T2 are associated with increased risk of age-related macular degeneration, *PLoS One*, 4(5), e5508.
- Santoro, A., Salvioli, S., Raule, N., Capri, M., Sevini, F., Valensin, S., Monti, D., Bellizzi, D., Passarino, G., Rose, G., De Benedictis, G., Franceschi, C., 2006, Mitochondrial DNA involvement in human longevity, *Biochim. Biophys. Acta*, 1757 (9-10), 1388-1399.
- 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, 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.
- Wallace D.C., 2005, A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine, *Annu. Rev. Genet.*, 39, 359-407.