

Polimorfismos genéticos de las regiones intrónicas de *ROMO1* no están asociados con el desarrollo de la osteoartritis de rodilla

Genetic polymorphisms of the ROMO1 intronic regions are not associated with the development of knee osteoarthritis

Claudia Frida Blancas-Meza,* Gabriela Martínez-Nava,† Alberto López-Reyes,‡ Yessica Zamudio-Cuevas,‡ Karina Martínez-Flores,‡ Denise Clavijo-Cornejo,‡ Roxana Miranda-Labra,§ María Concepción Gutiérrez-Ruíz,§ Luis Enrique Gómez-Quiroz,§ Carlos Pineda,|| Javier Fernández-Torres‡

* Departamento de Biología, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ciudad de México, México.

† Laboratorio de Líquido Sinovial. Instituto Nacional de Rehabilitación «Luis Guillermo Ibarra Ibarra». Ciudad de México, México.

§ Laboratorio de Fisiología Celular, Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Ciudad de México, México.

|| Dirección de Investigación. Instituto Nacional de Rehabilitación «Luis Guillermo Ibarra Ibarra». Ciudad de México, México.

Dirección para correspondencia:
Javier Fernández-Torres
Calzada México-Xochimilco 289
Colonia Arenal de Guadalupe, 14389
Tlalpan, Ciudad de México, México.
Teléfono: +52 1 5999-1000,
ext. 19502
E-mail: javier_astrofan@hotmail.com

Recibido: 28 de mayo de 2016.
Aceptado: 15 de agosto de 2016.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Resumen

La osteoartritis (OA) es un trastorno degenerativo que se caracteriza por la destrucción del cartílago articular, formación de osteofitos y esclerosis del hueso subcondral; su desarrollo y progresión están mediados por citocinas proinflamatorias, así como por la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Recientemente se ha identificado una proteína mitocondrial denominada Romo1 que modula las ERO en diferentes estados de estrés oxidante (EO), la cual es codificada por el gen *ROMO1*. Este gen presenta polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que probablemente afecten la traducción de las diferentes isoformas de su proteína asociada y se desconoce si éstos tengan implicaciones en la modulación de ERO en pacientes con OA. El objetivo del presente trabajo fue evaluar dos polimorfismos del gen *ROMO1* en muestras de pacientes con OA de rodilla. Este estudio reveló que los polimorfismos asociados no se relacionan con el desarrollo de OA, por lo que no pueden considerarse marcadores para estudios genéticos de OA en población mexicana.

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a degenerative disorder that is characterized by articular cartilage breakdown, osteophytes formation, and subchondral bone sclerosis; its development and progression are mediated by proinflammatory mediators, as well as by reactive oxidative species (ROS). Recently there has been identified a mitochondrial protein called Romo1 that modulates ROS in different states of oxidative stress, and which is encoded by the gene ROMO1. This gene has single nucleotide polymorphisms (SNPs) that could affect the translation of the different isoforms of its associated protein, and it is unknown whether these could have implications in the modulation of ROS in patients with OA. The aim of this work was evaluate two polymorphisms of ROMO1 gene in samples of patients with knee OA. We found that the analyzed polymorphisms are not associated with the presence of OA, therefore are not useful markers for genetic studies of OA in Mexican population.

Palabras clave: Osteoartritis, modulador de las especies reactivas de oxígeno 1, gen *ROMO1*, polimorfismos de un solo nucleótido, estrés oxidante.

Key words: Osteoarthritis, reactive oxygen species modulator 1, *ROMO1* gene, single nucleotide polymorphisms, oxidative stress.

Introducción

La osteoartritis (OA) es una enfermedad multifactorial crónico-degenerativa que se caracteriza por la pérdida gradual del cartílago articular con la consecuente disminución del espacio articular.¹ A nivel mundial se estima que 9.6% de los hombres y 18% de las mujeres mayores de 60 años presentan signos y/o síntomas de OA.²⁻⁵ De acuerdo con su severidad, éstos pueden ser crepitación, hinchazón, deformidad y destrucción de la articulación, lo que genera dolor crónico y discapacidad; siendo las rodillas, muñecas y cadera las articulaciones más frecuentemente afectadas.^{6,7}

Durante la OA hay formación de excrescencias óseas (osteofitos), esclerosis del hueso subcondral e inflamación de la membrana sinovial. Estos mecanismos son mediados por la secreción de moléculas catabólicas y proinflamatorias tales como citocinas (IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF), prostaglandina E2 y neuropéptidos (NPY, SP).⁸⁻¹³ También, durante estos mecanismos se generan especies reactivas del oxígeno (ERO) como anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (HO \bullet); y del nitrógeno (ERN) como el óxido nítrico (ON) y anión peroxinitrito (ONOO⁻),¹⁴ lo que condiciona un estado de estrés oxidante (EO) dañando severamente el ADN, proteínas y lípidos.¹⁵⁻¹⁷

Uno de los principales sitios de producción de ERO es la mitocondria, donde se ha determinado que 3% del oxígeno molecular (O₂) consumido a través de las cadenas de transporte de electrones se reduce de forma incompleta a anión O₂⁻ en lugar de agua.¹⁸ En tiempos recientes se ha identificado una proteína transmembranal de la mitocondria asociada a la regulación de ERO llamada Romo1, la cual consta de 79 aminoácidos (PM = 8.9 KDa).^{19,20} Aun cuando hay indicios de que Romo1 modula la producción de ERO, su papel y mecanismo de acción no se han comprendido en su totalidad. Esta proteína es codificada por el gen *ROMO1*, el cual se localiza en la banda 11.22 del brazo largo del cromosoma 20 y cuenta con una extensión

genómica de 1.6 Kb.^{21,22} Se han identificado poco más de 300 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) dentro de esta región,²³ los cuales pueden ejercer un efecto directo en su transcrito con implicaciones en la modulación de ERO. A la fecha no se han descrito polimorfismos del gen *ROMO1* asociados a la OA, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de dos SNPs del gen *ROMO1* en pacientes mexicanos con OA de rodilla.

Pacientes y métodos

Población de estudio

Estudio de casos y controles en el que participaron 140 individuos mayores de 40 años de ambos géneros, nativos de la región central de México y con padres y abuelos del mismo origen. Todos los participantes fueron notificados sobre el contenido del protocolo y firmaron una carta de consentimiento informado. Se reclutaron 70 pacientes con diagnóstico de OA de rodilla que acudieron al Servicio de Reumatología del Instituto Nacional de Rehabilitación «Luis Guillermo Ibarra Ibarra» (INR). El diagnóstico de la OA se basó en parámetros clínicos y radiográficos de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés).²⁴ El grupo control estuvo constituido por 70 individuos clínicamente sanos pareados por edad y género, sin antecedentes familiares de OA, los cuales fueron evaluados por reumatólogos del INR quienes certificaron la ausencia de signos y síntomas de OA de rodilla. Por otra parte, durante la evaluación clínica se aplicó a los participantes la encuesta de lesión de rodilla y puntaje para la osteoartritis de rodilla (KOOS, por sus siglas en inglés).

Recolección de muestras

De cada paciente se recolectaron dos muestras de sangre periférica por venopunción. Una muestra sin

anticoagulante se utilizó para obtener suero, el cual fue inmediatamente congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para realizar pruebas bioquímicas; la segunda muestra se recolectó en tubos con EDTA para la extracción y genotipificación del ADN genómico.

Determinación de parámetros bioquímicos

Se evaluaron los niveles de glucosa, colesterol total, triglicéridos y ácido úrico mediante técnicas colorimétricas utilizando un kit comercial para cada analito (Diagnostic Systems, Germany) y se cuantificaron por espectrofotometría (iMark, BioRad).

Obtención del ADN genómico

El ADN genómico se extrajo a partir de $200\text{ }\mu\text{L}$ de sangre total mediante el método de columna utilizando el kit comercial QIAGEN (Hilden, Germany) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN se determinó por espectrofotometría (Nanodrop 2000, ThermoScientific) y fue en promedio de $\sim 50\text{ ng}/\mu\text{L}$.

Selección y genotipificación de los SNPs de ROMO1

Los SNPs candidatos fueron seleccionados por los siguientes criterios: I) que estuvieran previamente reportados en la literatura científica; II) que estuvieran validados por el proyecto de los 1,000 genomas o por el HapMap;²⁵ III) que el alelo menor tuviera una frecuencia en la población mexicana mayor de 1%; y IV) que no se encontraran en desequilibrio de ligamiento (DL) entre sí. Se eligieron dos polimorfismos del gen *ROMO1* que cumplieran con estos criterios, el rs6060567 y el rs6060565. El método que se utilizó para la genotipificación de los SNPs candidatos fue por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real utilizando sondas TaqMan (AppliedBioSystem) en los equipos StepOnePlus (Applied Biosystem) y RotorGene (Qiagen), conforme a los protocolos establecidos por el proveedor.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de la población de estudio tomando en cuenta las covariables obtenidas de la evaluación clínica y del cuestionario. Estas covariables se compararon entre los casos y controles mediante la prueba de U de Mann-Whitney para variables continuas y con la prueba de χ^2 o la prueba exacta de

Fisher en el caso de las variables categóricas. Aquellas covariables que mostraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio se incluyeron en los análisis de regresión logística multivariada.

Se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y la distribución genotípica y alélica de ambos grupos mediante el método de χ^2 . Se calcularon las frecuencias genotípicas bajo tres modelos de herencia (dominante, recesivo y codominante) y con éstos se estimaron las razones de momios (RM) mediante modelos de regresión logística multivariados con un intervalo de confianza de 95% (IC 95%). Todo el análisis estadístico se realizó con el programa STATA v12; los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Características clínicas de los sujetos de estudio

Al comparar la edad en los dos grupos de estudio no hubo diferencia significativa ($p = 0.14$), teniendo una mediana de 44.5 años (controles) y 50 años (casos). Sin embargo, el índice de masa corporal (IMC) fue mayor en los casos (mediana de $30.6\text{ kg}/\text{m}^2$) que en los controles (mediana de $26.7\text{ kg}/\text{m}^2$). Por el tipo de diseño del estudio, el género no mostró diferencias en su distribución en ambos grupos de estudio al igual que el lugar de nacimiento. Todos los pacientes con OA de rodilla fueron clasificados en grado 2 de acuerdo con la escala radiológica de Kellgren-Lawrence.²⁶

Evaluación bioquímica

En cuanto a las variables bioquímicas, la única que presentó diferencias significativas entre casos y controles fue la glucosa, siendo mayor en los casos que en los controles (mediana de $99.0\text{ mg}/\text{dL}$ en casos y $78.9\text{ mg}/\text{dL}$ en controles; $p < 0.02$), aunque la mediana de ambos grupos se ubica dentro de los valores de referencia (*Cuadro I*).

Distribución de los SNPs

Los dos polimorfismos evaluados del gen *ROMO1* se encontraron en EHW ($p > 0.05$) en ambos grupos de estudio. Para el polimorfismo rs6060565 fue posible apreciar una mayor frecuencia en el grupo control del genotipo heterocigoto (C/T), así como del homocigoto para el alelo menor (T/T). En contraste, no se observó ningún portador para el genotipo T/T en los casos, aun

cuando la diferencia en la distribución de los genotipos entre los grupos de estudio no fue estadísticamente significativa ($p = 0.45$). Por su parte, el genotipo heterocigoto (G/C) del polimorfismo rs6060567 también fue más frecuente en controles que en casos, pero el genotipo homocigoto (C/C) para el alelo menor fue más frecuente en casos que en controles. Asimismo, la distribución de los genotipos entre casos y controles del SNP rs6060567 no fue significativa ($p = 0.65$) (*Cuadro II*).

Al calcular las frecuencias alélicas de ambos polimorfismos se detectó una tendencia similar en su distribución entre casos y controles que la encontrada con los genotipos. El alelo menor de ambos SNPs del gen *ROMO1* fue más frecuente en los controles que en los pacientes con OA; aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (*Cuadro II*).

En el *cuadro III* se muestran las RM de los dos polimorfismos estudiados ajustados por edad, IMC, glucosa en suero y lugar de nacimiento. El análisis de asociación se realizó bajo los tres modelos de herencia, así como por alelo de cada polimorfismo. Dada la baja frecuencia del genotipo T/T del polimorfismo rs6060665 no fue posible realizar el análisis de regresión logística multivariada con el modelo de herencia recesivo. Tanto para el genotipo heterocigoto C/T como para el modelo de herencia dominante (C/T + T/T) del polimorfismo rs6060565 se encontró una asociación negativa con la OA de rodilla (RM = 0.78, IC 95% = 0.31-1.96 para el genotipo C/T; y RM = 0.66, IC 95% = 0.25-1.80 para el modelo de herencia dominante), aun cuando ésta no fue estadísticamente significativa en ninguno de los dos casos. De igual

Cuadro I. Descripción de la población de estudio.

	Controles (n = 70)	Casos (n = 70)	p
Edad (años)			
Mediana (RI)	44.5 (10)	50.0 (11)	0.14 ^a
IMC (kg/m ²)			
Mediana (RI)	26.7 (6.20)	30.6 (6.74)	< 0.01 ^a
Ac. úrico (mg/dL)			
Mediana (RI)	6.0 (2.5)	5.7 (1.3)	0.08 ^a
Colesterol (mg/dL)			
Mediana (RI)	205.1 (58.7)	199.5 (35)	0.32 ^a
Glucosa (mg/dL)			
Mediana (RI)	78.9 (43.8)	99.0 (15.7)	< 0.02 ^a
Triglicéridos (mg/dL)			
Mediana (RI)	134.0 (115.3)	151.4 (88)	0.76 ^a
Género (%)			
Femenino	85.7	83.3	0.69 ^b
Masculino	14.3	16.7	
Lugar de nacimiento (%)			
Área metropolitana de la Ciudad de México	75.4	87.7	0.09 ^c
Otros estados	24.6	12.3	
El texto en negritas denota significancia estadística.			
^a Valor de p obtenido de la prueba de U de Mann-Whitney.			
^b Valor de p obtenido de la prueba de χ^2 .			
^c Valor de p obtenido de la prueba exacta de Fisher.			
RI= Rango intercuartil.			

forma, las RM observadas para el genotipo heterocigoto G/C (RM = 0.74, IC 95% = 0.27-2.02) como para el modelo dominante (G/C + C/C) del polimorfismo rs6060567 (RM = 0.82, IC 95% = 0.33-2.01) no fueron estadísticamente significativas.

No obstante, estas asociaciones mantuvieron la misma dirección de la asociación que la observada con el polimorfismo rs6060565. Esto es consistente con las RM resultantes del análisis por alelo, en el que se obtuvo una RM de 0.64 con el alelo menor T del polimorfismo rs6060565 y una RM de 0.9 con el alelo menor C del polimorfismo rs6060567; sin embargo, estas asociaciones no fueron estadísticamente significativas, incluso en el análisis por alelo (Cuadro III).

Discusión

La evaluación de los polimorfismos de regiones intrónicas rs6060565 y rs6060567 del gen *ROMO1* sugiere un potencial papel protector en el desarrollo de OA. La

falta de significancia en las asociaciones observadas entre los polimorfismos de las regiones intrónicas del gen *ROMO1* y la OA de rodilla puede deberse al número de pacientes y controles incluidos en este estudio, ya que en otras patologías con cohortes mayores ha sido posible detectar una asociación. A la fecha, poco se sabe sobre el papel de estos polimorfismos en la fisiopatología de la OA, pero también son pocos los estudios realizados que los han evaluado.

Wu et al. analizaron los polimorfismos rs6060566 y rs6060567 del gen *ROMO1* en pacientes chinos con

Cuadro II. Frecuencias genotípicas y alélicas para los polimorfismos del gen *ROMO1*.

Genotipo	Controles n = 70 (%)	Casos n = 70 (%)	p ^a
rs6060565			
C/C	47 (67.1)	51 (72.9)	0.45
C/T	21 (30)	19 (27.1)	
T/T	2 (2.9)	0 (0.0)	
Alelos			
C	115 (82.1)	121 (86.4)	0.41
T	25 (17.9)	19 (13.6)	
EHW	0.99	0.34	
rs6060567			
G/G	46 (65.7)	50 (71.4)	0.65
G/C	22 (31.4)	17 (24.3)	
C/C	2 (2.9)	3 (4.3)	
Alelos			
G	114 (81.4)	117 (83.6)	0.75
C	26 (18.5)	23 (16.4)	
EHW	0.37	0.99	

^a Valor de p obtenido de la prueba exacta de Fisher.

Cuadro III. Razones de momio para los polimorfismos del gen *ROMO1* y OA de rodilla.

Genotipo	Razones de momio ^a	Intervalo de confianza al 95%	p
rs6060565			
C/C	1		
C/T	0.78	0.31-1.96	0.60
T/T	1.56	0.09-27.07	0.76
C/T + T/T ^d	0.66	0.25-1.80	0.42
Alelos			
C	1		
T	0.64	0.26-1.54	0.32
rs6060567			
G/G	1		
G/C	0.74	0.27-2.02	0.55
C/C	---	---	---
G/C + C/C ^d	0.82	0.33-2.01	0.66
C/C ^r	1.71	0.10-28.94	0.71
Alelos			
G	1		
C	0.90	0.42-1.94	0.79

^a Razones de momio ajustadas por edad, IMC, glucosa sérica y lugar de nacimiento.

^d Modelo de herencia dominante. El genotipo de referencia lo constituye el genotipo homocigoto para el alelo más frecuente para cada polimorfismo (C/C para el polimorfismo rs6060565, y G/G para el polimorfismo rs6060567).

^r Modelo de herencia recesivo. El genotipo de referencia lo constituye el genotipo homocigoto para el alelo menor y el genotipo heterocigoto (G/G + G/C).

cáncer gástrico y determinaron que ambos polimorfismos estaban asociados al desarrollo de esta patología (genotipo T/C, $p = 1.48 \times 10^{-4}$, RM = 1.82; genotipo G/C, $p = 1.07 \times 10^{-4}$, RM = 1.85, respectivamente).²⁷ Es probable que la presencia de estos polimorfismos desregule la producción de ERO y altere la homeostasis óxido-reducción (redox) intracelular dañando el ADN y por ende, contribuyendo al desarrollo y progresión del cáncer gástrico.

Por su parte, Petrovic et al. evaluaron el papel del polimorfismo rs6060566 en pacientes diabéticos (tipo 2) con y sin retinopatía diabética y descubrieron una asociación positiva del genotipo C/C en aquellos pacientes con retinopatía (RM = 3.3, $p = 0.024$).²⁸ Por su carácter intrónico, dicho genotipo podría estar asociado a un *splicing* alternativo y afectar la expresión de Romo1, lo que genera un desbalance entre la síntesis y remoción de ERO (situación que propicia la acumulación de ERO a nivel celular ocasionando daño a nivel de ADN) en patologías que cursan con estrés oxidante crónico, tales como la retinopatía diabética y otras enfermedades crónico-degenerativas como la OA.^{14,15,17,18}

En un estudio comparativo sobre los efectos nocivos de ERO y ON en OA y artritis reumatoide (AR) se postula que hay una mayor actividad del ON para modular la función de los condrocitos en OA que en AR, ya que el ON inhibe la síntesis de proteoglicanos para mantener la homeostasis de la matriz extracelular.²⁹ Por otra parte, se ha observado que las ERO disminuyen la expresión de genes proinflamatorios, así como de genes que contribuyen al mantenimiento del cartílago articular.^{30,31}

Conclusiones

Éste es el primer reporte que describe la participación de SNPs del gen *ROMO1* en la OA de rodilla en nuestra población; no obstante, estos resultados preliminares se vieron limitados por el tamaño de la muestra y porque sólo se evaluaron dos polimorfismos de una región intrónica. Para ampliar el conocimiento sobre la participación de *ROMO1* en la OA será necesario incrementar el tamaño de la muestra, explorar otras variantes que se localicen en regiones promotoras y/o exónicas y de ser preciso, analizar muestras de pacientes con OA de diferentes regiones geográficas de nuestro país. Por último, para complementar estos estudios valdría la pena evaluar la expresión génica y proteica de Romo1 en cartílagos de pacientes con OA y poder determinar el papel que éste juega en la OA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Meulenbelt I. Osteoarthritis year 2011 in review: genetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012; 20 (3): 218-222.
2. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006; 20 (1): 3-25.
3. De Filippis L, Gulli S, Caliri A, Romano C, Munaò F, Trimarchi G et al. Epidemiology and risk factors in osteoarthritis: literature review data from "OASIS" study. *Reumatismo*. 2004; 56 (3): 169-184.
4. Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol Suppl*. 2011; 86: 3-8.
5. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ*. 2003; 81 (9): 646-656.
6. Fernández-Moreno M, Rego I, Blanco FJ. Genetics in osteoarthritis *Reumatol Clin*. 2007; 3 Suppl 3: S13-S18.
7. Chapman K, Valdes AM. Genetic factors in OA pathogenesis. *Bone*. 2012; 51 (2): 258-264.
8. Akkiraju H, Nohe A. Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. *J Dev Biol*. 2015; 3 (4): 177-192.
9. Atik OŞ, Erdoğan D, Seymen CM, Bozkurt HH, Kaplanoğlu GT. Is there crosstalk between subchondral bone, cartilage, and meniscus in the pathogenesis of osteoarthritis? *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi* 2016; 27 (2): 62-67.
10. Feng X, Shi Y, Xu L, Peng Q, Wang F, Wang X et al. Modulation of IL-6 induced RANKL expression in arthritic synovium by a transcription factor SOX5. *Sci Rep*. 2016; 6: 32001. doi: 10.1038/srep32001.
11. Rasheed N, Alghasham A, Rasheed Z. Lactoferrin from camelus dromedarius inhibits nuclear transcription factor-kappa B activation, cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in stimulated human chondrocytes. *Pharmacognosy Res*. 2016; 8 (2): 135-141.
12. Pérez-García S, Carrión M, Gutiérrez-Cañas I, González-Álvaro I, Gomariz RP, Juarranz Y. VIP and CRF reduce ADAMTS expression and function in osteoarthritis synovial fibroblasts. *J Cell Mol Med*. 2016; 20 (4): 678-687.
13. Utomo L, Bastiaansen-Jenniskens YM, Verhaar JA, van Osch GJ. Cartilage inflammation and degeneration is enhanced by pro-inflammatory (M1) macrophages in vitro, but not inhibited directly by anti-inflammatory (M2) macrophages. *Osteoarthritis Cartilage* 2016 Aug 5. pii: S1063-4584(16)30209-6. doi: 10.1016/j.joca.2016.07.018.
14. Ziskoven C, Jäger M, Zilkens C, Bloch W, Brixius K, Krauspe R. Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation? *Orthop Rev (Pavia)*. 2010; 2 (2): e23. doi: 10.4081/or.2010.e23.

15. Poulet B, Beier F. Targeting oxidative stress to reduce osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18: 32. doi: 10.1186/s13075-015-0908-7.
16. Chevalier X, Eymard F, Richette P. Biologic agents in osteoarthritis: hopes and disappointments. *Nat Rev Rheumatol*. 2013; 9 (7): 400-410. doi: 10.1038/nrrheum.2013.44.
17. Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1862 (4): 576-591. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.01.003.
18. De Biasi S, Gibellini L, Bianchini E, Nasi M, Pinti M, Salvioli S et al. Quantification of mitochondrial reactive oxygen species in living cells by using multi-laser polychromatic flow cytometry. *Cytometry A*. 2016 Aug 30. doi: 10.1002/cyto.a.22936.
19. Chung YM, Lee SB, Kim HJ, Park SH, Kim JJ, Chung JS et al. Replicative senescence induced by Romo1-derived reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2008; 283 (48): 33763-33771.
20. Chung YM, Kim JS, Yoo YD. A novel protein, Romo1, induces ROS production in the mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 347 (3): 649-655.
21. Chung JS, Lee SB, Park SH, Kang ST, Na AR, Chang TS et al. Mitochondrial reactive oxygen species originating from Romo1 exert an important role in normal cell cycle progression by regulating p27(Kip1) expression. *Free Radic Res*. 2009; 43 (8): 729-737.
22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/140823>
23. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29 (1): 308-311.
24. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1039-1049.
25. <http://browser.1000genomes.org/index.html>
26. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis*. 1957; 16 (4): 494-502.
27. Wu H, Gu YH, Wei L, Guo TK, Zhao Y, Su G et al. Association of Romo1 gene genetic polymorphisms with risk of gastric cancer in northwestern Chinese population. *Pathol Oncol Res*. 2015; 21 (3): 581-587.
28. Petrovic MG, Kruzliak P, Petrovic D. The rs6060566 of the reactive oxygen species modulator 1 (Romo-1) gene affects Romo-1 expression and the development of diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Acta Ophthalmol*. 2015; 93 (8): e654-e657. doi: 10.1111/aos.12723. Epub 2015 Mar 30.
29. Mazzetti I, Grigolo B, Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, Meliconi R et al. Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Sci*. 2001; 101 (6): 593-599.
30. 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.
31. Mathy-Hartert M, Martin G, Devel P, Deby-Dupont G, Pujol JP, Reginster JY et al. Reactive oxygen species downregulate the expression of pro-inflammatory genes by human chondrocytes. *Inflamm Res*. 2003; 52 (3): 111-118.