

TERAPIA GÉNICA Y FARMACOLÓGICA PARA LA ENCEFALOPATÍA MITOCONDRIAL ASOCIADA A LA DEFICIENCIA EN CoQ



GRUPO DE INVESTIGACIÓN CTS-101 Y BIO-326

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

GENYO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA. FACULTAD DE MEDICINA

PTS-GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ELIANA BARRIOCANAL CASADO

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Granada, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Eliana Barriocanal Casado
ISBN: 978-84-1306-235-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/56214>

CONTRATOS PREDOCTORALES:

- **Tipo de contrato:** Contratada predoctoral adscrita al Proyecto de Investigación de la Fundación Isabel Gemio “Todos somos raros, todos somos únicos” (TSR-2014-1). A tiempo completo desde el 15/05/2015 al 24/04/2017.

Organismo: Universidad de Granada.

Centro: Centro de Investigación Biomédica y Facultad de Medicina.

Departamento: Fisiología.

- **Tipo de contrato:** Contratada predoctoral a través del programa de empleo de garantía juvenil a tiempo completo desde el 31/01/2018.

Organismo: Universidad de Granada.

Centro: Centro de Investigación Biomédica y Facultad de Medicina.

Departamento: Fisiología.

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN:

- **Título del proyecto:** Targeting Nutrient-Sensing Signaling Pathways for the Treatment of Mitochondrial Diseases.

Referencia: TSR-2014-1

Investigador principal: Luis Carlos López

Entidad financiadora: Fundación “Todos somos raros, todos somos únicos”

Financiación: 97.000,00 €

Fecha de inicio: 03/2015

Fecha de fin: 04/2017

- **Título del proyecto:** Patogénesis y Tratamiento de la Deficiencia en Coenzima Q

Referencia: SAF2015-65786-R

Investigador principal: Luis Carlos López

Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad,
Gobierno de España

Financiación: 181.500,00 €

Fecha de inicio: 01/2015

Fecha de fin: 12/2018

PUBLICACIONES:

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en revistas internacionales:

1. **Barriocanal-Casado E**, Hidalgo-Gutiérrez A, Raimundo N, González-García P, Acuña-Castroviejo D, Escames G, López LC (2019). Rapamycin administration is not a valid therapeutic strategy for every case of mitochondrial disease. *EBioMedicine*. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.03.025
IF: 6.183; 13/133 (D1), Medicine, Research & Experimental.
2. **Barriocanal-Casado E**, Cueto-Ureña C, Benabdellah K, Gutierrez-Guerrero A, Cobo M, Hidalgo-Gutiérrez A, Rodríguez-Sevilla JJ, Martín F, and Lopez LC, (2016). Gene Therapy Corrects Mitochondrial Dysfunction in Hematopoietic Progenitor Cells and Fibroblasts from *Coq9^{R239X}* Mice. *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0158344.
IF: 2.806; 15/64 (Q1), Multidisciplinary sciences.

Otras publicaciones:

3. Hidalgo-Gutiérrez A, **Barriocanal-Casado E**, Bakkali M, Díaz-Casado ME, Sánchez-Maldonado L, Romero M, Sayed RK, Prehn C, Escames G, Duarte J, Acuña-Castroviejo D, López LC (2018). β -RA reduces DMQ/CoQ ratio and rescues the encephalopathic phenotype in *Coq9^{R239X}* mice. *EMBO molecular medicine*. DOI: 10.15252/emmm.201809466
IF: 10.293; 7/133 (D1), Medicine, Research & Experimental.
4. Rodríguez-Hidalgo M, Luna-Sánchez M, Hidalgo-Gutiérrez A, **Barriocanal-Casado E**, Mascaraque C, Acuña-Castroviejo D, Rivera M, Escames G, López LC (2018). Reduction in the levels of CoQ biosynthetic proteins is related to an increase in lifespan without evidence of hepatic mitohormesis. *Sci Rep*. 8(1):14013.
IF: 4.122; 12/64 (Q1), Multidisciplinary Sciences.
5. Luna-Sánchez M, Hidalgo-Gutiérrez A, Hildebrandt TM, Chaves-Serrano J, **Barriocanal-Casado E**, Santos-Fandila A, Romero M, Sayed RKA, Duarte J, Prokisch H, Schuelke M, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Lopez LC (2017). CoQ Deficiency Causes Disruption of

Mitochondrial Sulfide Oxidation, a new Pathomechanism Associated to this Syndrome. *EMBO molecular medicine* 9(1):78-95

IF: 10.293; 7/133 (D1), Medicine, Research & Experimental.

6. López A, Ortiz F, Doerrier C, Venegas C, Fernández-Ortiz M, Aranda P, Díaz-Casado ME, Fernández-Gil B, **Barriocanal-Casado E**, Escames G, López LC, Acuña-Castroviejo D, (2017). Mitochondrial impairment and melatonin protection in parkinsonian mice do not depend of inducible or neuronal nitric oxide synthases, *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0183090
IF: 2.766; Q1, 15/64 Multidisciplinary sciences.

COMUNICACIONES ORALES EN CONGRESOS RELACIONADOS CON ESTA TESIS DOCTORAL:

- Barriocanal-Casado Eliana, Luna-Sánchez M, Hidalgo-Gutiérrez A, López LC. **Targeting nutrient signaling pathways for the treatment of mitochondrial diseases.** 11th MiP Conference on Mitochondrial Physiology
- Barriocanal-Casado Eliana, Hidalgo-Gutiérrez A, Raimundo N, González-García P, Acuña-Castroviejo D, Escames G, López LC. **Rapamycin Administration is not a Valid Therapeutic Strategy for Every Case of Mitochondrial Disease.** I Congreso Nacional de Investigadores del PTS

POSTERS EN CONGRESOS RELACIONADOS CON ESTA TESIS DOCTORAL:

- Barriocanal-Casado Eliana, Hidalgo-Gutiérrez A, Luna-Sánchez M, Raimundo N, Mascaraque C, López LC. **Evaluating the rapamycin therapy in mitochondrial diseases.** Euromit 2017. 10th international meeting on mitochondrial pathology.
- Barriocanal-Casado Eliana, Cueto-Ureña C, Benabdellah K, Gutiérrez MA, García S, Guerra-Librero A, Hidalgo-Gutiérrez A, López L, Luna M, Nieto A, Real PJ, Martín F, López LC. **Gene Therapy Corrects Mitochondrial Dysfunction in MEFs and HSCs from *Coq9*^{R239X} Mice.** I Jornadas Científicas Genyo.

A mi familia

ABREVIATURAS

4-HB: 4-Hidroxibenzoato	MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón
AAV: Vector adenoasociado	MELAS: encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y accidente cerebrovascular
AHSCT: trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas	mHSCs: Células madre hematopoyéticas de ratón
ATP: Adenosina trifosfato	MLD: Leucodistrofia metacromática
ADP: Adenosina difosfato	MNGIE: encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial
cDNA: DNA complementario	mRNA: RNA mensajero
CoQ: Coenzima Q	mtDNA: DNA mitocondrial
COX: Citocromo oxidasa	NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido
CRM: Cadena respiratoria mitocondrial	NMD: Degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras
CTE: Cadena de transporte de electrones	OXPHOS: Sistema de fosforilación oxidativa.
DMQ: Demetoxiubiquinona	RNA: Ácido ribonucleico
DNA: Ácido desoxirribonucleico	ROS: especies reactivas del oxígeno
EE: Encefalopatía etilmalónica	SC: Supercomplejo
FAD: Flavín adenin dinucleótido	SNC: Sistema nervioso central
GT: (<i>Gene therapy</i>). Terapia génica	SNP: Sistema nervioso periférico
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución	TCA: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
LC-HRMS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución	TOM: Translocasa de la membrana externa
LOHN: Neuropatía óptica hereditaria de Leber	
LV: Vector lentiviral	

TIM: Translocasa de la membrana interna

UCP: proteína desacoplante

UPRmt: Respuesta mitocondrial a proteínas desplegadas

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

ÍNDICE

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	9
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 LA MITOCONDRIA	15
1.1.1 IMPORTANCIA FUNCIONAL	15
1.1.2 ORGANIZACIÓN INTERNA.....	16
1.1.3 FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL	19
1.1.4 FORMACIÓN DE SUPERCOMPLEJOS	24
1.1.5 LA COENZIMA Q.....	26
1.1.5.1 El Complejo Q: Biosíntesis de Coenzima Q.....	27
1.1.5.2 Funciones de la Coenzima Q	33
1.2 ENFERMEDADES MITOCONDRIALES	36
1.2.1 DEFICIENCIA EN COENZIMA Q	40
1.2.1.1 Deficiencia Primaria en Coenzima Q.....	40
1.2.1.2 Deficiencia Secundaria en Coenzima Q.....	46
1.3 TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES ..	49
1.3.1 OPCIONES TERAPÉUTICAS ACTUALES	50
1.3.1.1 Estrategias farmacológicas. Suplementos dietéticos.....	50
1.3.1.2 Ejercicio	55
1.3.2 TERAPIAS EMERGENTES	55
1.3.2.1 Inhibición de mTORC1.....	56

1.3.2.2 Terapia génica.....	58
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
3.1 CONSTRUCCIÓN Y PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES.....	69
3.2 MODELOS CELULARES.....	71
3.2.1 FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN.....	71
3.2.2 CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS DE RATÓN.....	71
3.2.2.1 Aislamiento de mHSCs de ratones donantes.....	71
3.2.2.2 Cultivo y transducción de mHSCs.....	72
3.3 MODELO ANIMAL. GRUPOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS.....	73
3.3.1 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS.....	74
3.3.2 TERAPIA GÉNICA.....	75
3.3.2.1 Terapia celular-génica con mHSCs.....	75
3.3.2.2 Terapia génica con vectores virales adenoasociados.....	76
3.4 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	77
3.5 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO Y CÉLULAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT.....	78
3.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CoQ.....	80
3.7 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR Y MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS DEPENDIENTES DE CoQ.....	82
3.8 MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN TEJIDO.....	83

3.9 MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN CÉLULAS ..	86
3.10 HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA	87
3.11 IMAGEN Y ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA (MRI Y MRS) IN VIVO	88
3.12 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO RNA-Seq.....	88
3.13 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS Y ANÁLISIS LC-HRMS.....	90
3.14 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE RAPAMICINA EN SANGRE	91
3.15 CITOMETRÍA DE FLUJO.....	92
3.16 ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN Y CRECIMIENTO EN TIEMPO REAL	93
3.17 ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES SANGUÍNEOS MEDIANTE HEMOGRAMA	94
3.18 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	94
4. RESULTADOS	101
4.1 TERAPIA FARMACOLÓGICA: INHIBICIÓN DE mTOR.....	101
4.1.1 LA RAPAMICINA NO MEJORA LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS RATONES <i>Coq9^{R239X}</i>	101
4.1.2 LAS LESIONES CEREBRALES PERMANECEN TRAS EL TRATAMIENTO CON RAPAMICINA EN LOS RATONES <i>Coq9^{R239X}</i>	104
4.1.3 LA RAPAMICINA INHIBE mTORC1 SIN INDUCIR AUTOFAGIA EN LOS RATONES <i>Coq9^{R239X}</i>	108

4.1.4 LA RAPAMICINA MODIFICA EL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO Y METABOLÓMICO DE LOS RATONES <i>Coq9^{R239X}</i>	113
4.1.5 LA RAPAMICINA NO ALTERA LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DE LOS RATONES <i>Coq9^{R239X}</i>	120
4.1.6 LA MODULACIÓN DE LAS VÍAS DOWNSTREAM DE mTORC1 TAMPOCO TIENE EFECTO TERAPÉUTICO EN LOS RATONES <i>Coq9^{R239X}</i>	124
4.2 TERAPIA GÉNICA: RESTAURACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Coq9	127
4.2.1 TERAPIA <i>EX VIVO</i> : DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA PARA EL TRATAMIENTO DE RATONES <i>Coq9^{R239X}</i> MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE mHSCs SOBREEXPRESANDO <i>Coq9</i>	127
4.2.1.1 Sobreexpresión de proteína COQ9 funcional y análisis de la capacidad de corrección.....	128
4.2.1.1.1 Los vectores lentivirales CCoq9WP sobreexpresan COQ9 en mHSC	128
4.2.1.1.2 La sobreexpresión de COQ9 restaura la función de la ruta de biosíntesis en MEFs y mHSCs procedentes de ratones <i>Coq9^{R239X}</i>	130
4.2.1.1.3 La sobreexpresión de COQ9 normaliza la función mitocondrial y mejora el crecimiento de los MEFs <i>Coq9^{R239X}</i>	134
4.2.1.2 Repoblación de los tejidos de los ratones <i>Coq9^{R239X}</i> con células mHSCs/CCoq9WP.....	137
4.2.1.2.1 El busulfán produce ablación de la médula ósea permitiendo una colonización de las mHSCs donantes en los tejidos de los ratones <i>Coq9^{R239X}</i>	137
4.2.1.2.2 Ensayo piloto de terapia en ratones <i>Coq9^{R239X}</i>	144
4.2.2 TERAPIA GÉNICA <i>IN VIVO</i> : ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE VECTORES ADENOASOCIADOS EXPRESANDO <i>Coq9</i>	147

5. DISCUSIÓN	153
5.1 LA RAPAMICINA NO ES UNA TERAPIA VÁLIDA PARA TODAS LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES	153
5.2 TERAPIA CELULAR-GÉNICA: LA NECESIDAD DE SUPERAR ALGUNAS LIMITACIONES	162
5.3 TERAPIA GÉNICA CON VECTORES ADENOASOCIADOS AAV9 .	173
6. CONCLUSIONES	179
6. CONCLUSIONS	183
7. BIBLIOGRAFÍA	187

RESUMEN

RESUMEN

La mitocondria es un orgánulo fundamental presente en la mayoría de las células del organismo donde se llevan a cabo muchas reacciones y procesos metabólicos celulares, entre ellos la producción de la mayor parte de la energía que necesitan las células en forma de ATP a través de la cadena de transporte de electrones acoplada a una fosforilación oxidativa. Por ello, un fallo en cualquiera de los múltiples procesos que integra la mitocondria o que puedan afectar a su estructura desencadena las llamadas enfermedades mitocondriales. Si bien, éstas se definen comúnmente como aquellas que afectan directa o indirectamente a la cadena respiratoria mitocondrial y, por tanto, presentan defectos en la fosforilación oxidativa y la producción de ATP. Así, las enfermedades mitocondriales constituyen un conjunto muy heterogéneo de enfermedades genéticas que afectan a 1 de cada 5.000 personas en el mundo, con distinto grado de severidad y que pueden manifestarse con daños en cualquier órgano o tejido, con frecuencia en múltiples sistemas y, de forma predominante, con manifestaciones miopáticas y neurológicas. A día de hoy no existe cura para la mayoría de estas enfermedades y los tratamientos se limitan a cuidados paliativos basados en distintos suplementos, ejercicio o intervenciones en caso de complicaciones.

Eliana Barriocanal Casado

La rapamicina, un inhibidor del complejo mTORC1, ha emergido recientemente como una droga potencialmente terapéutica para las enfermedades mitocondriales, ya que ha mostrado ciertos beneficios terapéuticos en algunos modelos de ratón con distintas enfermedades mitocondriales. Sin embargo, el mecanismo terapéutico de la rapamicina en estos casos no está claro, y tampoco se sabe si esta terapia puede utilizarse de forma general para las enfermedades mitocondriales, ni cuál sería la dosis mínima efectiva. Nosotros hemos evaluado si la administración crónica de rapamicina tanto a dosis baja como a dosis alta podría tener efectos terapéuticos en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}* de encefalopatía mitocondrial asociada a una deficiencia generalizada y muy severa en coenzima Q (CoQ), un transportador de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial. Nuestros resultados muestran que la rapamicina a dosis baja induce cambios metabólicos en el hígado y altera el perfil transcriptómico en el mesencéfalo. La dosis alta induce cambios transcriptómicos más profundos en el mesencéfalo debido a una inhibición general de mTORC1. Sin embargo, ninguna de las dosis logró mejorar la bioenergética mitocondrial, las características histopatológicas, ni las manifestaciones fenotípicas de los ratones *Coq9^{R239X}*, resultando en un fracaso de esta terapia para aumentar la supervivencia. De la misma manera, la administración de drogas que actúan sobre vías aguas abajo de mTORC1 como la trehalosa, un inductor de

autofagia, o PF-4708671, un inhibidor de la síntesis de lípidos y proteínas, no tuvo efecto terapéutico. El fracaso de esta terapia en el modelo *Coq9*^{R239X} podría deberse a una ausencia de neuroinflamación derivada de microgliosis, la incapacidad de inducir autofagia o reprimir la respuesta a estrés mitocondrial UPRmt o la necesidad de una función residual de la CoQ, a diferencia de lo que ocurre en los modelos de ratón *Ndufs4*^{-/-}, *Cox15*^{sm/sm}, *Twnk*^{dup} o *Tk2*^{H126N}, en los que la rapamicina sí ha tenido efecto terapéutico. Por tanto, la traslación clínica de la terapia con rapamicina para pacientes con enfermedades mitocondriales requiere, al menos, la consideración de las particularidades de cada enfermedad mitocondrial.

Otra estrategia que ha cobrado gran fuerza en los últimos años para el tratamiento de diferentes enfermedades monogénicas es la terapia génica. Ensayos clínicos recientes han mostrado que las estrategias de terapia génica *in vivo* y *ex vivo* pueden ser una buena opción para el tratamiento de varias enfermedades neurológicas. Ambas estrategias requieren vectores eficientes y seguros, ya sea para proporcionar directamente el gen terapéutico en el SNC, o para modificar genéticamente células madre que puedan utilizarse como vehículos para proporcionar la proteína terapéutica de forma sistémica a otras células residentes en el tejido, produciéndose una corrección cruzada. Dentro de las enfermedades neurológicas, un grupo atractivo para el uso de estas

Eliana Barriocanal Casado

estrategias son las encefalopatías mitocondriales causadas por mutaciones en genes del DNA nuclear.

Nosotros hemos desarrollado un vector lentiviral (CCoq9WP) capaz de sobreexpresar el mRNA de *Coq9* y la proteína COQ9 en fibroblastos embrionarios (MEFs) y células madre hematopoyéticas (mHSCs) de ratones *Coq9*^{R239X}. La sobreexpresión ectópica de *Coq9* en ambos tipos celulares restauró la ruta biosintética de CoQ y la función mitocondrial, mejorando la capacidad de crecimiento de las células transducidas. Estos resultados mostraron el potencial de los vectores lentivirales como herramienta para la terapia génica de las encefalopatías mitocondriales. Desafortunadamente, nuestro ensayo preliminar de terapia génica *ex vivo* usando vectores SCoq9WP para transducir mHSCs fracasó como terapia para los ratones *Coq9*^{R239X}, lo cual podría deberse a la baja sobreexpresión conseguida en las células donantes tras la transducción en este ensayo, unos niveles de repoblación en el SNC insuficientes, la limitada ventana terapéutica en nuestro modelo de ratón, o la imposibilidad de transferir proteínas mitocondriales a otras células. Por tanto, futuros ensayos que utilicen esta estrategia deberán abordar cada uno de estos aspectos para determinar el potencial de la terapia génica *ex vivo* en el tratamiento de encefalopatías mitocondriales.

Por último, en relación a las estrategias de terapia génica *in vivo*, muchos estudios preclínicos están apostando en los últimos años por el uso de vectores adenoasociados para tratar diferentes enfermedades mitocondriales gracias a su perfil de seguridad, su capacidad de mantener la expresión durante períodos de tiempo relativamente largos y la disponibilidad de serotipos con tropismos diferentes. Nosotros hemos utilizado el vector AAV9/Coq9 de amplio tropismo en un estudio piloto para corregir el déficit de CoQ en distintos tejidos en los ratones *Coq9^{R239X}*. El vector AAV9/Coq9 fue capaz de corregir los niveles de CoQ y DMQ (el sustrato de la reacción donde está involucrada la proteína COQ9) en corazón, músculo esquelético y, en menor medida, hígado. Sin embargo, no tuvo efecto sobre los riñones ni el cerebro, y la supervivencia siguió el perfil de los ratones mutantes, indicando que estos tejidos podrían jugar un papel importante en la patofisiología de la encefalopatía mitocondrial asociada a la deficiencia en CoQ.

Eliana Barriocanal Casado

SUMMARY

SUMMARY

Mitochondria are essential organelles found in almost all cells of the organism. This organelle carries out many cellular reactions and metabolic processes, such as the production of most of the energy that the cells need in the form of ATP through the electron transport chain coupled to an oxidative phosphorylation. Because of that, a failure in any of the multiple processes that take place in the mitochondria or that may affect their structure triggers the so-called mitochondrial diseases. However, these are commonly defined as those that directly or indirectly affect the mitochondrial respiratory chain and, therefore, present defects in oxidative phosphorylation and ATP production. Therefore, mitochondrial disorders represent a heterogeneous group of genetic diseases with a prevalence of 1:5,000 individuals. They can affect any organ or tissue, but many involve multiple physiological systems, and often present with prominent neurologic and myopathic features. To date, there is no cure for the vast majority of the mitochondrial diseases and the treatments are limited to palliative care based on different supplements, exercise, or some interventions for organ specific-complications.

Rapamycin, an mTORC1 inhibitor, has emerged as a potential therapeutic drug for mitochondrial diseases since it has shown therapeutic benefits in a few mouse models of mitochondrial disorders. However, the underlying

Eliana Barriocanal Casado

therapeutic mechanism is unclear, the minimal effective dose needs to be defined and whether this therapy can be generally used is unknown. We have evaluated whether low and high doses of chronic rapamycin administration may result in therapeutic effects in a mouse model (*Coq9^{R239X}*) of mitochondrial encephalopathy due to a general and severe deficiency of coenzyme Q (CoQ), an electron carrier of the mitochondrial respiratory chain. Our results show that low dose of rapamycin induces metabolic changes in liver and transcriptomics modifications in midbrain. The high dose of rapamycin induces further changes in the transcriptomics profile in midbrain due to the general inhibition of mTORC1. However, neither low nor high dose of rapamycin were able to improve the mitochondrial bioenergetics, the histopathological features and the phenotypic characteristics of *Coq9^{R239X}* mice, resulting in the lack of efficacy for increasing the survival. Similarly, the use of some drugs that acts on mTORC1 downstream pathways, such as trehalose, an inducer of autophagy, or PF-4708671, an inhibitor of lipid and protein synthesis, did not lead to therapeutic benefits. The failure of this therapy in the *Coq9^{R239X}* mouse model may be due to the lack of microgliosis-derived neuroinflammation, the limitation to induce autophagy or repress UPRmt, or the need of a functional CoQ-junction, unlike what occurs in the *Ndufs4^{-/-}*, *Cox15^{sm/sm}*, *Twnk^{dup}* or *Tk2^{H126N}* mouse models, in which rapamycin has shown therapeutic effect.

Therefore, the translation of rapamycin therapy into the clinic for patients with mitochondrial disorders requires, at least, the consideration of the particularities of each mitochondrial disease.

Another strategy that has been widely exploited in recent years for the treatment of different monogenic diseases is gene therapy. Recent clinical trials have shown that *in vivo* and *ex vivo* gene therapy strategies can be an option for the treatment of several neurological disorders. Both strategies require efficient and safe vectors to deliver the therapeutic gene directly into the CNS, or to genetically modify stem cells that will be used as vehicles for the systemic delivery of the therapeutic protein to other resident cells, resulting in a cross-correction. A group of target diseases for these therapeutic strategies are mitochondrial encephalopathies due to mutations in nuclear DNA genes.

Here, we have developed a lentiviral vector (LV), CCoq9WP, able to overexpress *Coq9* mRNA and COQ9 protein in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and hematopoietic stem cells (HSCs) from *Coq9*^{R239X} mice. Ectopic over-expression of *Coq9* in both cell types restored the CoQ biosynthetic pathway and mitochondrial function, improving the fitness of the transduced cells. These results show the potential of the LVs as a tool for gene therapy to treat mitochondrial encephalopathies. Unfortunately, our preliminary study of *ex vivo* gene therapy using mHSCs transduced with SCoq9WP LVs failed to

Eliana Barriocanal Casado

induce therapeutic benefits in *Coq9^{R239X}* mice. This result could be due to the insufficient *Coq9* overexpression on mHSCs, insufficient engraftment into the affected tissues (including CNS), the limited therapeutic window in our mouse model, or the inability to transfer mitochondrial proteins between different cells. Therefore, future studies should tackle these shortcomings in order to evaluate the potential of *ex vivo* gene therapy for the treatment of mitochondrial encephalopathies.

Finally, recent preclinical studies have reported the use of adeno-associated vectors (AAV) to treat different mitochondrial diseases *in vivo* through direct administration of the therapeutic vectors. AAVs present multiple advantages for *in vivo* applications, a good safety profile, their ability to maintain expression for long time and the availability of different serotypes with different tropisms. We have used the AAV9/*Coq9* vector with wide tropism in a pilot study to correct the CoQ deficiency in different tissues of *Coq9^{R239X}* mice. The AAV9/*Coq9* vector was able to correct the levels of CoQ and DMQ (the substrate of the reaction that involved the COQ9 protein) in heart, skeletal muscle and, to a lesser extent, in the liver. However, it had no effect on the kidneys nor the brain, and the survival exhibited the same profile than the untreated mutant mice, indicating that these tissues could play fundamental roles in the pathophysiology of the mitochondrial encephalopathy associated to CoQ deficiency.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA MITOCONDRIA

1.1.1 IMPORTANCIA FUNCIONAL

Las mitocondrias son orgánulos presentes en la mayoría de las células del organismo con múltiples funciones, siendo la más conocida la producción de la mayor parte de la energía que necesitan las células en forma de ATP. Más allá de la síntesis de ATP, son orgánulos esenciales en el metabolismo y la biología celular, ya que integran e interconectan múltiples procesos metabólicos como la fosforilación oxidativa, la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs, la biosíntesis de pirimidinas, el metabolismo de aminoácidos, el metabolismo lipídico, el metabolismo del sulfuro, el ciclo de la urea, la gluconeogénesis o la cetogénesis; y juegan un papel fundamental en otros muchos procesos celulares, como la progresión del ciclo celular, la diferenciación, la termogénesis, la homeostasis del calcio, el estado redox, la respuesta inmune o la apoptosis (Gorman et al., 2016; Nunnari & Suomalainen, 2012; Spinelli & Haigis, 2018).

Por todo ello, muchos autores definen la mitocondria como el principal centro metabólico celular, ya que controlan y regulan múltiples procesos celulares. Son orgánulos muy dinámicos capaces de reorganizarse y

Eliana Barriocanal Casado

coordinar la adaptación de la célula a diferentes requerimientos y/o situaciones de estrés que varían no solo según el ambiente, sino también en función del tejido. De hecho, las mitocondrias de los distintos órganos están especializadas tanto en el uso de ciertos combustibles, como en la síntesis de compuestos a través de determinadas rutas metabólicas (Liesa & Shirihai, 2013). Por ejemplo, el ciclo de la urea, a través del cual se produce urea, se inicia específicamente en las mitocondrias del hígado; la gluconeogénesis tiene lugar en hígado y riñón; y mientras las mitocondrias del músculo esquelético son capaces de oxidar ácidos grasos, las neuronas pueden oxidar cetonas.

1.1.2 ORGANIZACIÓN INTERNA

Para llevar a cabo estas funciones, las mitocondrias cuentan con una organización muy particular. Son orgánulos delimitados por dos membranas que desempeñan un papel crucial en dichas actividades, y tienen además su propio genoma circular (DNA mitocondrial, o mtDNA del inglés “*mitochondrial DNA*”) con características muy específicas y cuya maquinaria de replicación y transcripción se organiza como nucleoides.

La membrana externa es una bicapa lipídica permeable a iones y algunas moléculas no cargadas menores de 10 kDa a través de proteínas de membrana, llamadas porinas, como el canal aniónico dependiente de voltaje

(VDAC, de sus siglas en inglés). Las moléculas más grandes, especialmente las proteínas codificadas en el núcleo, deben ser importadas por translocasas especiales, como el complejo TOM (del inglés “*Translocase of the Outer Membrane*”). Dada esta porosidad, no existe potencial de membrana a través de la membrana mitocondrial externa (Kühlbrandt, 2015).

Por el contrario, la membrana interna constituye una barrera muy selectiva al paso de iones y moléculas, siendo permeable únicamente a ciertas moléculas, como el oxígeno. El resto de moléculas solo pueden atravesar dicha membrana con ayuda de transportadores específicos de membrana, cada uno de los cuales es específico para un ión o molécula particular. Esto le permite mantener un potencial de membrana electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna (Kühlbrandt, 2015). Así, la membrana interna tiene un contenido proteico elevado, entorno al 80% de proteínas (y sólo un 20% de lípidos), formando parte del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), de los transportadores de metabolitos, proteínas e iones entre el citosol y la mitocondria, como el complejo TIM (del inglés, “*translocase of the inner membrane*”), así como de proteínas desacoplantes (UCPs, “*uncoupling proteins*”). Entre su fracción lipídica destaca un lípido muy característico de esta membrana, la cardiolipina. Esta membrana separa dos compartimentos en la mitocondria: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial; y forma invaginaciones de la membrana que se extienden

Eliana Barriocanal Casado

dentro de la matriz, esto es, estructuras especializadas llamadas crestas mitocondriales.

El espacio intermembrana juega, junto con la membrana mitocondrial externa, un papel importante en la coordinación de las actividades mitocondriales con otros procesos celulares (Herrmann & Riemer, 2010).

La matriz mitocondrial contiene varias copias del DNA mitocondrial, las proteínas necesarias para su replicación y transcripción, los ribosomas para la traducción de proteínas codificadas en dicho genoma, y otras proteínas y enzimas implicadas en los diversos procesos metabólicos que ocurren dentro de la matriz, como el ciclo de Krebs (o TCA, del inglés “*tricarboxylic acid*”), la β -oxidación de ácidos grasos, la biosíntesis de pirimidinas o el ciclo de la urea (Kühlbrandt, 2015).

En las crestas mitocondriales es donde tiene lugar la fosforilación oxidativa, en la que un conjunto de proteínas que se asocian formando complejos y éstos, a su vez, supercomplejos, crean un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna que es provechado por la H^+ -ATP sintasa para producir ATP.

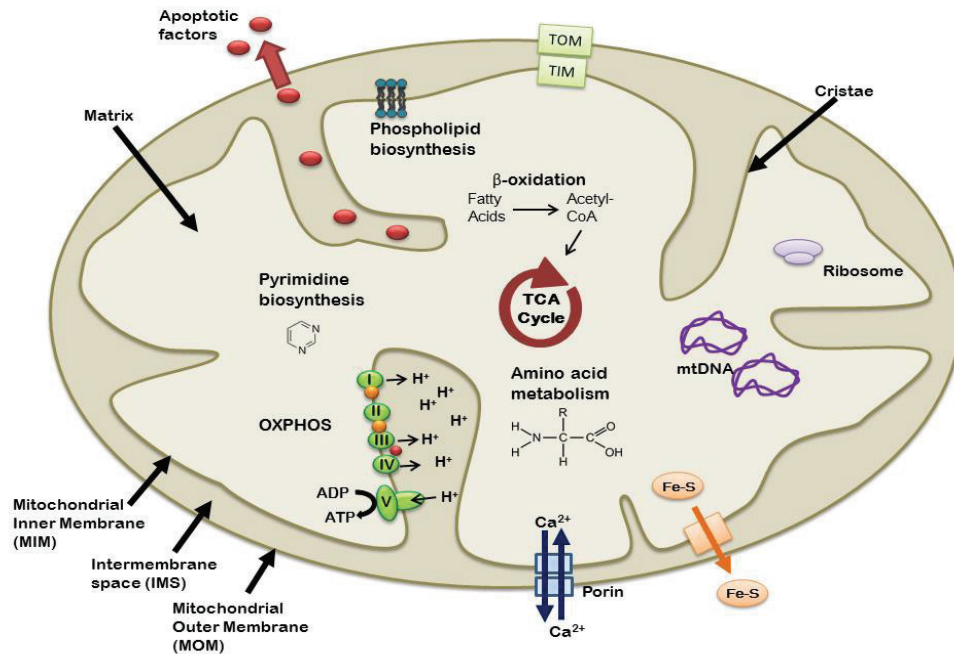


Figura 1. Esquema-resumen de la estructura y funciones de la mitocondria.

1.1.3 FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

La fosforilación oxidativa es un proceso metabólico por el cual la mitocondria utiliza los electrones procedentes del metabolismo de los azúcares, proteínas y grasas para producir energía en forma de ATP (Letts & Sazanov, 2017). Es un proceso muy particular en el que se acoplan 3 procesos diferentes (Enríquez, 2016):

1. La oxidación de equivalentes reducidos a través de la cadena respiratoria mitocondrial o cadena de transporte de electrones (CRM o CTE). En la

matriz mitocondrial se generan equivalentes reducidos, en forma de NADH o FADH₂, a través de diversos procesos metabólicos, como el TCA o la oxidación de ácidos grasos, que vuelven a su estado oxidado cediendo sus electrones a la CRM y, finalmente, al oxígeno.

2. El bombeo de protones a través de algunos de los complejos que forman parte de esa CRM. La oxidación del NADH y FADH₂ está acoplada al bombeo de protones por parte de los complejos respiratorios I, III y IV, que aprovechan la energía liberada en la transferencia de electrones para generar un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna.
3. La síntesis de ATP a través de la H⁺-ATP sintasa (complejo V), que utiliza ese gradiente de protones para producir energía a partir de ADP.

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) está compuesto por tanto por 4 complejos respiratorios (complejo I [CI] – complejo IV [CIV]), dos transportadores móviles de electrones (ubiquinona o coenzima Q [CoQ] o ubiquinol cuando está en su estado reducido [CoQH₂], y citocromo C), y un quinto complejo (complejo V [CV]), la ATP sintasa (Enríquez, 2016) (Fig. 2).

El complejo I es la NADH:ubiquinona oxidorreductasa (o NADH deshidrogenasa) y es el punto de entrada de los electrones procedentes del NADH en la CRM, que se transfieren posteriormente a la CoQ, pasando a su

estado reducido COQH_2 . Por cada 2 electrones transferidos desde el NADH hasta la CoQ, este complejo bombea 4 protones H^+ desde la matriz mitocondrial hacia el lumen de la cresta mitocondrial, contribuyendo al establecimiento del gradiente electroquímico de protones (Δp) a través de la membrana interna (Letts & Sazanov, 2017). Es el más complejo de la cadena respiratoria y en mamíferos se han identificado hasta 45 subunidades, 7 de las cuales están codificadas en el DNA mitocondrial y el resto en el nuclear, que en conjunto suman un peso molecular de ~ 1 MDa (Stroud et al., 2016; Zhu, Vinothkumar, & Hirst, 2016).

El complejo II o succinato:ubiquinona oxidoreductasa (o succinato deshidrogenasa, SDH) recibe los electrones procedentes del succinato y los transfiere a la CoQ, pasando primero a través del cofactor FAD unido covalentemente en el sitio de unión al succinato formando parte del complejo (Hägerhäll, 1997; Sun et al., 2005). Es la única enzima que participa en el ciclo de Krebs y la CRM, el único complejo de la CRM que no tiene subunidades codificadas en el DNA mitocondrial y el único complejo que no bombea protones a través de la membrana mitocondrial interna durante el ciclo catalítico, aunque contribuye indirectamente al Δp a través de la reducción del pool de ubiquinonas (Hägerhäll, 1997; Letts & Sazanov, 2017; Rutter, Winge, & Schiffman, 2010; Sun et al., 2005).

Eliana Barriocanal Casado

La coenzima Q (CoQ) es un lípido que recibe electrones del complejo I y del complejo II de forma secuencial para pasarlos al complejo III. Así, soporta continuamente ciclos de oxidación-reducción en la CRM mediante una transferencia de electrones en dos pasos, de manera que puede encontrarse en 3 estados: completamente oxidada (ubiquinona), completamente reducida (ubiquinol), o en una forma intermedia (semiubiquinona).

El complejo III o ubiquinol:citocromo *c* reductasa o complejo citocromo bc1 recibe los electrones del ubiquinol (CoQH₂) y los transfiere a una pequeña proteína transportadora del espacio intermembrana, el citocromo *c*, bombeando protones H⁺ en el proceso. En mamíferos está formado por 11 subunidades, de las cuales solo una (el citocromo *b*) está codificada en el mtDNA y alberga dos sitios diferentes de unión a CoQ, uno para la forma oxidada y otro para la forma reducida (ubiquinol, CoQH₂) (Xia et al., 1997).

El citocromo *c* es una pequeña proteína de 104 aminoácidos codificada en el DNA nuclear involucrada en otros procesos además de su participación en la cadena de transporte de electrones, como la apoptosis o la formación y depuración de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés “*reactive oxygen species*”) (Hüttemann et al., 2011). Se reduce captando los electrones del complejo III y los transfiere al complejo IV.

El complejo IV o citocromo *c* oxidasa (COX) cataliza el último paso de transferencia de electrones, que van desde el citocromo *c* hasta el oxígeno molecular, reduciéndose en dos moléculas de agua al tiempo que bombea protones H^+ al espacio intermembrana. Se compone de 14 subunidades, tres de las cuales están codificadas en el DNA mitocondrial (Balsa et al., 2012).

Finalmente, la H^+ -ATP sintasa o complejo V aprovecha la energía que se genera a partir de ese gradiente electroquímico de protones para sintetizar ATP a partir de ADP en la matriz mitocondrial.

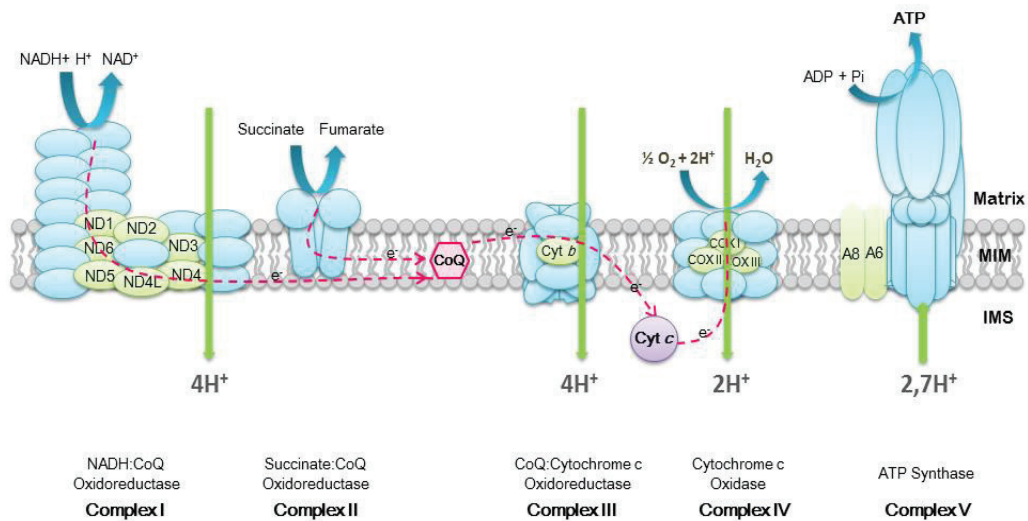


Figura 2. Sistema OXPHOS.

Cabe destacar que la cadena respiratoria mitocondrial es una fuente importante de ROS, especialmente a través de los complejos I y III. Estas especies reactivas del oxígeno pueden reaccionar rápida e

Eliana Barriocanal Casado

indiscriminadamente con proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos produciendo daños en la estructura y función de estas macromoléculas e incluso mutaciones en el DNA. Afortunadamente, la mitocondria cuenta con varios mecanismos antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa (MnSOD), que se encargan de eliminarlas y mantenerlas en niveles normales, lo cual es necesario ya que se ha demostrado que también juegan un papel fisiológico importante (Murphy, 2009).

1.1.4 FORMACIÓN DE SUPERCOMPLEJOS

La organización física y funcional de este sistema en la membrana mitocondrial interna ha sido objeto de intenso debate y a lo largo de los años se han propuesto distintos modelos, pasando del modelo sólido, propuesto en 1947, donde los componentes de la CRM se suponían como entidades rígidas unidas formando una estructura supramolecular que posteriormente tomó el nombre de oxisoma o respirasoma para garantizar la accesibilidad y una alta eficiencia en el transporte de electrones (Chance, Estabrook, & Lee, 1963; Keilin & Hartree, 1947); hasta el modelo fluido o de colisiones arbitrarias (Green & Tzagoloff, 1966; Hackenbrock, Chazotte, & Gupte, 1986), en el que los complejos respiratorios difunden libremente por la membrana y la transferencia de electrones se produce por colisiones al azar entre los complejos y los transportadores móviles; y, finalmente en el año 2000, gracias al trabajo de Schägger y Pfeiffer (Schägger & Pfeiffer, 2000), aparece

el concepto de “supercomplejos respiratorios” (SC) para definir asociaciones de los complejos respiratorios que permitirían una transferencia de electrones más eficiente. Este descubrimiento y otros posteriores dieron paso a un tercer modelo, el modelo de plasticidad, que integra en cierto modo los dos modelos anteriores, ya que postula que los complejos pueden aparecer individualmente, o bien asociarse en diferentes combinaciones según las necesidades energéticas de la célula, de modo que el ratio entre complejo libre y supercomplejo depende del tipo celular y el estado metabólico (Acín-Pérez, Fernández-Silva, Peleato, Pérez-Martos, & Enriquez, 2008; Moreno-Loshuertos & Enríquez, 2016). El ensamblaje secuencial de las subunidades, complejos y SC requiere de factores de ensamblaje y chaperonas y es un proceso muy regulado. Dado que tanto los complejos individuales como los SC son funcionales en la respiración, se han propuesto distintas ventajas de la organización de la cadena respiratoria en supercomplejos, como el aporte de una mayor estabilidad a los complejos individuales para su correcto ensamblaje, la disminución de la producción de ROS al secuestrar intermediarios reactivos en su interior, o la canalización de los electrones a través de las moléculas transportadoras (CoQ y citocromo *c*) con el fin de aumentar la eficiencia de la transferencia de electrones (Enríquez, 2016; Sousa, D'Imprima, & Vonck, 2018). Además, experimentalmente se ha visto que el ensamblaje de los SC es un mecanismo dinámico que permite a las

Eliana Barriocanal Casado

células adaptarse a diferentes fuentes de carbono o condiciones fisiológicas y/o ambientales (ausencia de nutrientes, hipoxia o procesos de diferenciación), construyendo cadenas de transporte específicas según los requerimientos celulares. Así, por ejemplo, en condiciones de ayuno se activa la degradación de ácidos grasos, de manera que se reducen los niveles de CI en los SC, dejando más CIII accesible para los electrones procedentes del FADH_2 (Lapunte-Brun et al., 2013).

Un fallo en cualquier punto de todo este sistema OXPHOS puede derivar en una enfermedad mitocondrial. Asimismo, se ha visto que defectos en un complejo del supercomplejo pueden desencadenar efectos sobre otros complejos (Lapunte-Brun et al., 2013). Sin embargo, la inmensa cantidad de información que tenemos a día de hoy acerca de este sistema ni siquiera es suficiente para explicar las múltiples consecuencias fenotípicas derivadas de su disfunción.

1.1.5 LA COENZIMA Q

La coenzima Q o ubiquinona es una molécula lipofílica formada por un anillo benzoquinona hidroxilado en las posiciones 1,4, lo que le proporciona su capacidad redox, unido a una cadena lateral poliisoprenoide de longitud variable que le confiere el carácter hidrofóbico para mantenerse estable dentro de la bicapa lipídica (Fig. 3). El número de moléculas de isopreno que

forman la cadena varía entre especies (entre 6-10), aunque pueden coexistir distintas formas en la misma especie. Por ejemplo, en los seres humanos la forma mayoritaria es la CoQ₁₀, con 10 unidades isoprenoides formando la cadena, pero también existe CoQ₉ (con 9 isoprenos en la cadena lateral) de forma minoritaria; mientras que en los ratones es al revés.

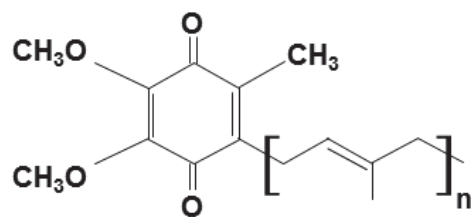


Figura 3. Estructura de la CoQ

1.1.5.1 El Complejo Q: Biosíntesis de Coenzima Q

La biosíntesis endógena de CoQ requiere, por tanto, la síntesis del anillo benzoquinona por un lado y de la cadena lateral por otro, seguido de la conjugación de ambos y modificaciones posteriores sobre el anillo. Todo ello tiene lugar principalmente dentro de la mitocondria. Su caracterización ha sido posible gracias al estudio de mutantes de *coq* en levaduras, aunque la ruta completa no está definida en su totalidad. En la actualidad se han descrito al menos 14 proteínas codificadas en el DNA nuclear involucradas en la ruta biosintética de CoQ en levaduras: COQ1-COQ11, YAH1, ARH1 y PTC7, aunque algunas de ellas parecen no participar directamente en la

biosíntesis. De hecho, la función de algunas de estas proteínas es todavía desconocida o especulativa, como es el caso de COQ4, COQ8, COQ9, COQ10 o COQ11 (Stefely & Pagliarini, 2017). Curiosamente, muchas de estas proteínas (COQ3-COQ9 y COQ11) también interactúan entre sí y se asocian en un complejo multiproteico anclado a la membrana mitocondrial interna llamado “*CoQ synthome*” en levaduras o Complejo Q en humanos, y es esencial para la biosíntesis de CoQ, ya que puede mejorar la eficacia catalítica y minimizar el escape de intermediarios que podrían ser tóxicos (Fig. 4). Es más, los intermediarios de la biosíntesis de CoQ son compuestos bastante hidrófobos y, al menos algunos de ellos, parecen ser esenciales en el anclaje de ese Complejo Q a la membrana (Awad et al., 2018).

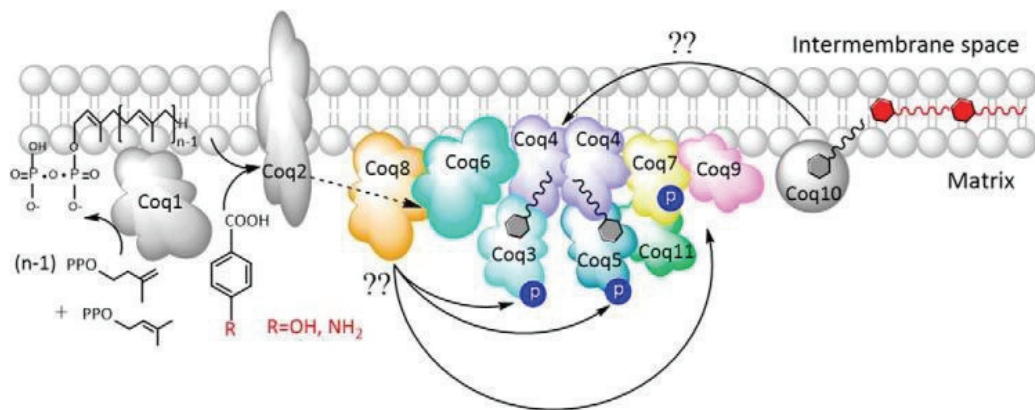


Figura 4. Complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ. (Allan et al., 2015)

El precursor del anillo benzoquinona es el 4-hidroxibenzoato (4-HB), derivado de la tirosina o fenilalanina a través de una serie de reacciones que aún necesitan ser caracterizadas (Kawamukai, 2016; Pierrel, 2017). Se sabe que

se sintetiza en el citosol, por lo que el anillo debe ser importado a la matriz a través de algún transportador aún no identificado (Stefely & Pagliarini, 2017). La cadena poliisoprenoide proviene de la ruta del mevalonato, hecho que comparte, entre otras moléculas, con el colesterol y el dolicol. La poliprenil difosfato sintasa (PDSS1/PDSS2 en forma de heterotetrámero en humanos, o COQ1 en levaduras) es la responsable de formar esta cola precursora y es además la que determina la longitud de la cadena en función de las especies. COQ2 se encarga de condensar el anillo y la cola en una molécula, el ácido 3-hexaprenil-4-hidroxi benzoico (HHB). A continuación se llevan a cabo distintas modificaciones sobre el anillo por el Complejo Q: hidroxilación en el carbono C-5, llevado a cabo por COQ6; O-metilaciones llevadas a cabo por COQ3; hidroxilación y descarboxilación en el C-1, que son pasos en los que no se sabe exactamente qué proteínas participan; metilación en C-2 por COQ5; e hidroxilación en C-6 por COQ7 (Fig. 5). En levaduras, la hidroxilación en C-5 requiere de la presencia de dos proteínas YAH1, ARH1 (ferredoxina y ferredoxina reductasa, respectivamente), que se cree que proporcionan los electrones a COQ6. Sin embargo, la función de sus ortólogos en mamíferos, FDX2 y FDXR, en la biosíntesis de CoQ permanece aún desconocida (Awad et al., 2018). PTC7 es una fosfatasa encargada de desfosforilar a COQ7, permitiendo que se lleve a cabo el penúltimo paso de la biosíntesis de CoQ.

Eliana Barriocanal Casado

La proteína COQ4 se ha visto que es esencial para la biosíntesis de CoQ y se cree que actúa como una proteína andamio del complejo Q que une tanto proteínas como lípidos (Awad et al., 2018; Marbois, Gin, Gulmezian, & Clarke, 2009; Stefely & Pagliarini, 2017).

COQ8, en mamíferos COQ8A (o ADCK3) y COQ8B (o ADCK4), parece ser importante en la integridad del Complejo Q y se cree que es una kinasa involucrada en la fosforilación de otras proteínas del complejo como COQ3, COQ5 y COQ7, aunque no se sabe si directa o indirectamente. También se especula que pueda tener actividad ATPasa y que podría fosforilar lípidos u otras moléculas pequeñas. Sin embargo, aún se desconoce exactamente cómo esta actividad kinasa o ATPasa podría estabilizar el complejo Q para potenciar la biosíntesis de CoQ (Stefely & Pagliarini, 2017).

De igual manera, COQ9 también estabiliza el complejo Q a través de mecanismos aún por esclarecer. Nuestro grupo demostró que COQ9 es necesaria para la estabilidad y función de COQ7, ya que ratones con mutación en el gen *Coq9* presentaban una reducción muy severa de COQ7 y acumulación del sustrato de ésta, la demetoxiubiquinona (DMQ) (García-Corzo et al., 2013). Estudios de cristalografía posteriores confirmaron que COQ9 está asociada a COQ7 y que tiene un sitio de unión a lípidos, de manera que se piensa que podría actuar captando intermediarios hidrófobos de CoQ de la membrana para exponérselos a otras enzimas del complejo,

como COQ7 (Lohman et al., 2014). También se ha postulado que podría ser un sensor de lípidos que regularía alostéricamente el Complejo Q por unión de ligando.

COQ10 (COQ10A y COQ10B en humanos) parece no formar parte del Complejo Q y se piensa que no está implicada directamente en la biosíntesis de CoQ, ya que los mutantes nulos para *coq10* en levaduras tienen niveles de CoQ cercanos a los *wild-type* (Barros et al., 2005). Sin embargo, sí parece ser importante para la funcionalidad de la CoQ y, por consiguiente, para el correcto funcionamiento de la cadena de transporte de electrones. Contiene un dominio conservado de unión a lípidos, capaz de unir CoQ y sus intermediarios *in vitro* e *in vivo*, lo que sugiere que podría actuar como una chaperona de lípidos involucrada en la transferencia de CoQ de un lado a otro dentro de la membrana mitocondrial (Barros et al., 2005; Busso, Bleicher, Ferreira-Júnior, & Barros, 2010; Cui & Kawamukai, 2009).

Recientemente, se ha visto que COQ11 también forma parte del Complejo Q gracias a estudios de inmunoprecipitación, aunque no es esencial para la biosíntesis de CoQ (Allan et al., 2015). Todavía hoy se desconoce su función (Stefely & Pagliarini, 2017).

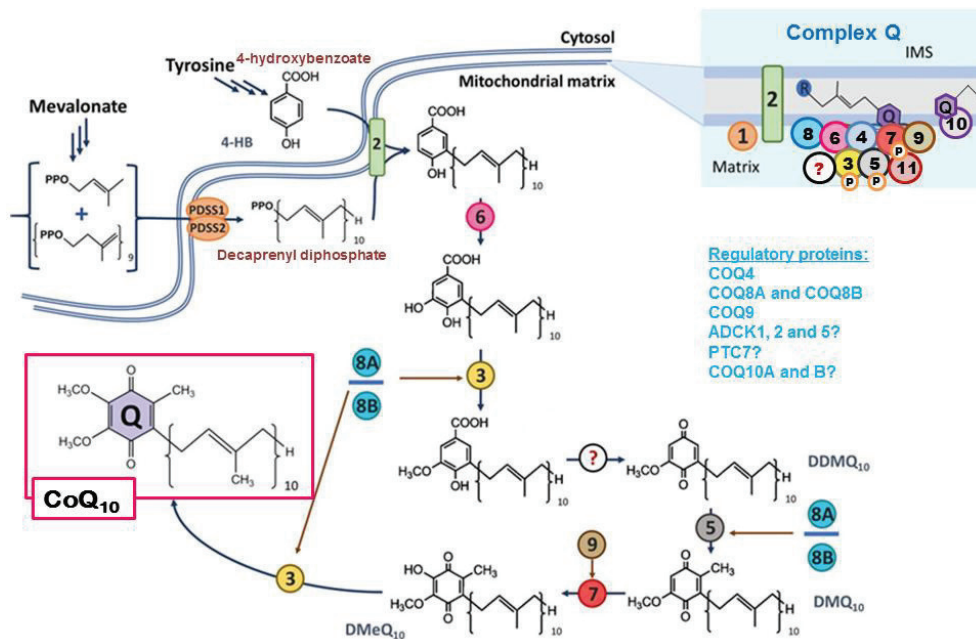


Figura 5. Biosíntesis de CoQ. Modificada de (Alcázar-Fabra, Trevisson, & Brea-Calvo, 2018).

Aún no se conoce mucho sobre la regulación de la síntesis de CoQ, aunque se han descrito algunos mecanismos: a nivel transcripcional, a través de distintos factores de transcripción (Bentinger, Turunen, Zhang, Wan, & Dallner, 2003; Brea-Calvo, Siendones, Sánchez-Alcázar, de Cabo, & Navas, 2009); post-transcripcional, a través de proteínas de unión a RNA que modulan la estabilidad de los transcritos de *COQ* (Cascajo et al., 2016; Lapointe et al., 2018); post-traduccionnal, a través de proteasas y ciclos de fosforilación-desfosforilación (Martín-Montalvo et al., 2013); o incluso durante el ensamblaje de cada uno de los componentes del complejo multiproteico.

Una vez sintetizadas las moléculas de CoQ, se transportan a todas las membranas celulares, incluida la membrana plasmática, y a las lipoproteínas de la sangre para llevar a cabo distintas funciones.

1.1.5.2 Funciones de la Coenzima Q

En la membrana mitocondrial interna la CoQ es un componente esencial de la CRM, aceptando electrones y protones del CI y CII para pasarlos al CIII. Además, aunque en menor proporción, a través de la CoQ pueden entrar electrones a la CRM procedentes de otras actividades enzimáticas, como la dihidroorotato deshidrogenasa (DHOH), que participa en la síntesis *de novo* de pirimidinas; la flavoproteína:ubiquinona oxidoreductasa (ETF, de “*electron transfer flavoprotein*”), que conecta la β -oxidación de ácidos grasos y la oxidación de aminoácidos ramificados con la CRM (J. Zhang, Frerman, & Kim, 2006); la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) mitocondrial, que actúa de lanzadera de electrones procedentes de equivalentes reducidos del citoplasma (NADH), conectando la glicolisis, la fosforilación oxidativa y el metabolismo de ácidos grasos; la colina deshidrogenasa (CHDH), que participa en el metabolismo de la glicina; la prolina deshidrogenasa (PDH), involucrada en el metabolismo de la prolina y la arginina; o la sulfuro:quinona oxidoreductasa (SQOR), involucrada en el metabolismo del sulfuro (Alcázar-Fabra et al., 2018; Enriquez & Lenaz, 2014; Enríquez, 2016; Stefely & Pagliarini, 2017) (Fig. 6). Por tanto, la CoQ

es un cofactor esencial en todos estos procesos y, una vez reducida a través de ellos, se re-oxida nuevamente por el complejo III de la CRM.

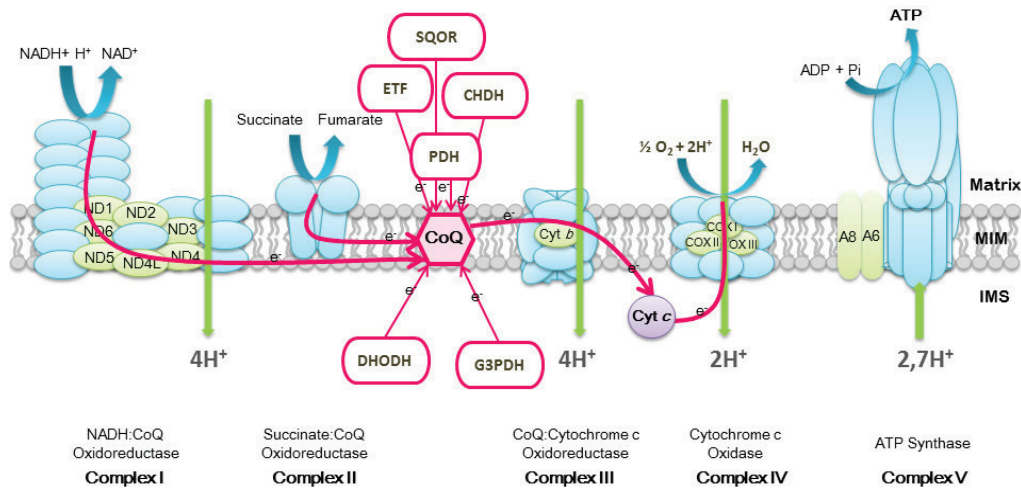


Figura 6. Papel de la CoQ en la cadena respiratoria mitocondrial.

Además de funcionar como cofactor de esas deshidrogenasas mitocondriales, algunos estudios en sistemas artificiales indicaron que también es cofactor obligatorio de las llamadas proteínas desacoplantes (UCPs) (Echtay, Winkler, & Klingenberg, 2000), que son proteínas de la membrana mitocondrial interna que translocan protones H⁺ desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial, desacoplando así, y de ahí su nombre, el gradiente de protones (generado en la cadena respiratoria) de la fosforilación oxidativa, de manera que la energía liberada lo hace en forma de calor y no se produce ATP. Este es precisamente el mecanismo que utilizan los mamíferos en la grasa parda para mantener la temperatura

corporal en situaciones de bajas temperaturas (Nedergaard et al., 2001). No obstante, estudios posteriores pusieron en duda que la CoQ tuviera papel alguno en la actividad de las UCPs (Esteves, Echtay, Jonassen, Clarke, & Brand, 2004; Jaburek & Garlid, 2003).

La capacidad de la CoQ para soportar ciclos continuos de oxidación-reducción hacen que sea no sólo un buen transportador de electrones en diferentes procesos celulares, sino también un potente antioxidante en las membranas, protegiendo a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos del daño oxidativo. Se ha visto que el ubiquinol (CoQH₂) puede prevenir la iniciación y la propagación de la peroxidación lípídica en las membranas (Bentinger, Brismar, & Dallner, 2007) y que, indirectamente, es capaz de regenerar otros antioxidantes, como el α -tocoferol (vitamina E) y el ascórbico (vitamina C) (Alcázar-Fabra et al., 2018). Se ha comprobado también que funciona como antioxidante en las lipoproteínas del plasma humano (Stocker, Bowry, & Frei, 1991).

Varios estudios sugieren que la CoQ ejerce un papel de modulación de la permeabilidad del poro de transición mitocondrial (PTPm, del inglés “*mitochondrial permeability transition pore*”) (Fontaine, Ichas, & Bernardi, 1998; Walter, Miyoshi, Leverve, Bernard, & Fontaine, 2002; Walter et al., 2000), que son canales y transportadores iónicos que regulan el paso de moléculas a través de la membrana interna. La apertura del poro de transición

Eliana Barriocanal Casado

permite el paso de moléculas de hasta 1500 Da, lo que podría conducir al colapso de las funciones mitocondriales. La CoQ sería uno de los componentes que regulan esta apertura, evitando la despolarización del potencial de membrana, depleción de ATP, liberación del citocromo *c* al citosol, activación de la caspasa-9 y fragmentación del DNA (Bentinger, Tekle, & Dallner, 2010; Papucci et al., 2003).

La importancia de las funciones que desempeña la CoQ en la célula la convierten en una molécula vital, y su deficiencia está asociada con una gran variedad de manifestaciones clínicas que se encuadra dentro de las llamadas enfermedades mitocondriales.

1.2. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Las enfermedades mitocondriales constituyen el grupo de enfermedades metabólicas innatas más común, estimándose que afecta a 1 de cada 5.000 personas en todo el mundo (Parikh et al., 2015). Dado que la mitocondria es crucial en múltiples funciones celulares, no es extraño pensar que las consecuencias de su disfunción pueden ser muy variadas y de distinto grado de severidad. Así, se definen como un grupo muy heterogéneo de enfermedades genéticas que incluyen cualquier defecto en alguno de los múltiples procesos que ocurren dentro de la mitocondria o que puedan afectar a su estructura, como defectos en el ciclo de Krebs (Metodiev et al., 2014), o

el transporte de cofactores (Gerards et al., 2013), entre otros. No obstante, comúnmente se habla de enfermedades mitocondriales como aquellas que afectan directa o indirectamente a la cadena respiratoria mitocondrial y, por tanto, presentan defectos en la fosforilación oxidativa y la producción de ATP. En total, se estima que pueden estar involucrados unos 1.500 genes (o proteínas) en la función mitocondrial, aunque en el inventario actual de la MitoCarta2.0 se han detallado sólo 1.158 proteínas hasta el momento (Calvo, Clauser, & Mootha, 2016), y en mayo de 2018 se tenían descritos hasta 309 genes implicados en enfermedades mitocondriales en humanos a la espera de identificar más variantes patológicas (Stenton & Prokisch, 2018) (Fig. 7).

Las enfermedades mitocondriales pueden estar causadas por mutaciones en el DNA nuclear o mitocondrial, por lo que pueden tener cualquier patrón de herencia: autosómica recesiva, autosómica dominante o herencia ligada al cromosoma X, para mutaciones que afectan al DNA nuclear; o herencia materna para mutaciones que afectan al DNA mitocondrial. Incluso se han descrito casos de mutaciones *de novo* tanto en el DNA mitocondrial como en el nuclear, aunque no son muy frecuentes (King et al., 2018; Sallevelt et al., 2017; Thompson et al., 2016). En los pacientes con mutaciones en el DNA mitocondrial la herencia es aún más compleja debido a la existencia de múltiples copias de este DNA dentro de la célula, que puede variar de cientos a varios miles (más de 10.000 en oocitos maduros), de manera que coexisten

copias *wild-type* y copias mutadas dentro de una misma célula, y es lo que se llama heteroplasmia. El nivel de heteroplasmia es importante en la determinación del fenotipo y generalmente se requiere un alto porcentaje de copias del DNA mutado (>50%) para que se produzcan defectos celulares.

Oxidative phosphorylation enzymes	Assembly	DNA, RNA, and protein synthesis	Substrate	Cofactors	Homeostasis
<p>Complex I</p> <p>NDUFA1 NDUFA2 NDUFA9 NDUFA10 NDUFA11 NDUFA12 NDUFA13 NDUFB3 NDUFB9 NDUFB11 NDUFS1 NDUFS2 NDUFS3 NDUFS4 NDUFS6 NDUFS7 NDUFS8 NDUFV1 NDUFV2 MT-ND1 MT-ND2 MT-ND3 MT-ND4 MT-ND4L MT-ND5 MT-ND6</p>	<p>Complex II</p> <p>SDHA SDHB SDHD</p> <p>Complex III</p> <p>CYC1 UQCRCB UQCRCQ UQCRC2 MT-CYB</p> <p>Cytochrome c oxidase</p> <p>COX4I2 COX6A1 COX6B1 COX7B COX8A NDUFA4 TACO1 MT-CO1 MT-CO2 MT-CO3</p> <p>ATP synthase</p> <p>ATPSA1 ATP5E MT-ATP6 MT-ATP8</p> <p>Complex IV</p> <p>SURF1 CEP89 COX14 (C12orf62) COX20 (FAM36A) COA5 COA7 FASTKD2 PET100</p> <p>ATP synthase</p> <p>ATPAF2 TMEM70</p>	<p>Replication</p> <p>POLG POLG2 TWNK MGME1 DNA2 RNASEH1</p> <p>Nucleotides</p> <p>ABAT DGUOK MPV17 RRM2B SAMHD1 SLC25A4 SUCLA2 SUCLG1 TK2 TYMP</p> <p>RNA metabolism</p> <p>ELAC2 HSD17B10 MTPAP LRPPRC GTPBP3 MTO1 NSUN3 PNPT1 TRMT5 TRMT10C TRNT1 PUS1 TRIT1 TRMU</p> <p>Translation regulation</p> <p>GFM1 GFM2 TSFM TUFM RMND1 C12orf65</p> <p>Ribosomes</p> <p>MRPS7 MRPS16 MRPS22 MRPS23 MRPL3 MRPL12 MRPL44 MT-RNR1</p> <p>MT-TA MT-TC MT-TD MT-TE MT-TF MT-TG MT-TH MT-TI MT-TK MT-TL1 MT-TL2 MT-TM MT-TN MT-TP MT-TQ MT-TR MT-TS1 MT-TS2 MT-TT MT-TV MT-TW MT-TY</p> <p>MT-FMT AARS2 CARS2 DARS2 EARS2 FARS2 GARS HARS2 IARS2 KARS LARS2 MARS2 NARS2 PARS2 QRSL1 RARS2 SARS2 TARS2 VARS2 YARS2</p> <p>tRNA synthetases</p>	<p>Pyruvate dehydrogenase</p> <p>PDHA1 PDHB PDHX PDP1 DLAT PDK3</p> <p>Krebs cycle</p> <p>ACO2 FH IDH3B</p> <p>Carriers</p> <p>MPC1 SLC25A3 SLC25A12</p> <p>Anaplerosis</p> <p>PC CASA</p> <p>P_i</p> <p>PPA2</p> <p>Ketone bodies</p> <p>ACAT1 HMGCL HMGCS2 OXCT1</p> <p>Fatty acid oxidation</p> <p>ACADM ACADS ACADS8 ACADVL CPT1A CPT2 HADH HADHA HADHB SLC22A5 SLC25A20 ETFA ETFB ETFDH</p>	<p>Thiamine</p> <p>SLC19A3 SLC25A19 TPK1</p> <p>Lipoic acid</p> <p>LIAS LIPT1 DLD MECR</p> <p>FeS clusters</p> <p>BOLA3 FDX1L FXN GLRX5 IBAS7 ISCA2 ISCU LYRM4 NFU1 NFS1 NUBPL</p> <p>Coenzyme Q</p> <p>ADCK3 ADCK4 COQ2 COQ4 COQ6 COQ7 COQ9 PDS51 PDS52</p> <p>Biotin</p> <p>BTD HILCS</p> <p>Cu</p> <p>SCO1 SCO2 COA6</p> <p>Heme</p> <p>COX10 COX15 PPOX SLC25A38 CYCS HCCS</p> <p>Coenzyme A</p> <p>COASY PANK2 SLC25A42</p> <p>FAD NAD(P) Fe</p> <p>FLAD1 SLC25A32 NADK2 NAXE SFXN4</p> <p>SAM</p> <p>SLC25A26</p>	<p>Lipid</p> <p>TAZ AGK SERAC1 DNAJC19</p> <p>Protein import</p> <p>TIMM8A TIMM50 AIFM1 GFER PMPCA XPINPEP3</p> <p>Protein quality</p> <p>HSPD1 CLPB CLPP HTRA2 LONP1 PITRM1 MIEPE AFG3L2 SPG7 SACS</p> <p>Fission and fusion</p> <p>DNM1L GDAP1 MFF MFN2 OPA1 SLC25A46 STAT2 YME1L1</p> <p>Ca²⁺</p> <p>MICU1 QIL1 (c19orf70)</p> <p>Unclear function</p> <p>APOPT1 CHCHD10 FBXL4 OPA3</p> <p>Inhibitors</p> <p>ETHE1 D2HGDH L2HGDH SLC25A1 ECHS1 HIBCH HTT TXN2</p>

Figura 7. Relación de genes cuyas mutaciones han sido asociadas a enfermedades mitocondriales en humanos. Tomada de (Craven, Alston, Taylor, & Turnbull, 2017).

Además, las enfermedades mitocondriales pueden manifestarse a cualquier edad, ya sea en fase neonatal, etapa infantil, adolescencia o edad adulta, aunque son más frecuentes en las primeras etapas de la vida, con una prevalencia estimada de 5-15 pacientes de 0 a 16 años por cada 100.000 individuos (sobre un total de 23 por cada 100,000) (Gorman et al., 2016). Aparecen con un amplísimo rango de síntomas clínicos y, dado que las mitocondrias están presentes en todas las células del organismo (salvo los eritrocitos), pueden afectar a cualquier órgano o tejido aislado, como el ojo en la enfermedad de LHON (“*Leber hereditary optic neuropathy*”), aunque lo más común es que se vean afectados múltiples sistemas y, especialmente, aquellos órganos con una alta dependencia del metabolismo aerobio debido a sus altos requerimientos de energía, como es el caso del cerebro, el músculo esquelético y el corazón (Craven et al., 2017; Gorman et al., 2016). De hecho, muchas manifestaciones de las enfermedades mitocondriales presentan síntomas neurológicos y, de forma general, son las enfermedades neurológicas hereditarias más comunes (McFarland, Taylor, & Turnbull, 2010; Tucker, Compton, & Thorburn, 2010). Algunas características clínicas de las enfermedades mitocondriales pueden agruparse en síndromes específicos, como por ejemplo el síndrome de Leigh (o encefalopatía necrotizante subaguda), MNGIE (encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial), o MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y

Eliana Barriocanal Casado

episodios parecidos a un accidente cerebrovascular). Sin embargo, muchos de los pacientes no se ajustan a perfiles tan discretos, de manera que no siempre es posible categorizarlos. El grado de severidad de las enfermedades mitocondriales es también un rasgo muy variable, pero suelen ser enfermedades con una evolución progresiva y con una elevada morbilidad y mortalidad.

1.2.1 DEFICIENCIA EN COENZIMA Q

La deficiencia en CoQ es una enfermedad mitocondrial que puede estar causada por mutaciones en los genes involucrados directamente en su biosíntesis, en cuyo caso se habla de deficiencia primaria en coenzima Q; o bien deberse a mutaciones en otros genes no relacionados con su biosíntesis o derivar de otros procesos fisiopatológicos o farmacológicos, dando lugar a las conocidas como deficiencias secundarias en CoQ.

1.2.1.1 Deficiencia Primaria en Coenzima Q

Las deficiencias primarias en CoQ son desórdenes autosómicos recesivos con un espectro clínico muy heterogéneo que tradicionalmente se ha agrupado en 5 grandes fenotipos (Emmanuele et al., 2012): (1) Encefalomiopatía caracterizada por afectación cerebral y mioglobinuria recurrente; (2) desorden multisistémico infantil con encefalopatía asociada normalmente a nefropatía y afectación de otros órganos; (3) ataxia

cerebelosa; (4) síndrome nefrótico resistente a esteroides; y (5) miopatía aislada.

Sin embargo, esta clasificación hoy por hoy está desactualizada, ya que el espectro de los fenotipos clínicos observados en los pacientes es mucho más amplio y, por ejemplo, aún no se ha documentado ningún caso de miopatía aislada en personas genéticamente identificadas como pacientes con deficiencia primaria en CoQ (Alcázar-Fabra et al., 2018; Desbats, Lunardi, Doimo, Trevisson, & Salviati, 2015).

Hasta la fecha se han documentado en la literatura alrededor de 200 pacientes de 130 familias con mutaciones en distintos genes de la ruta biosintética de CoQ en todo el mundo, aunque análisis predictivos han estimado que pueden llegar a los 123.789 pacientes (1 de cada 50,000 individuos) (Hughes, Harrison, & Hekimi, 2017). Se han encontrado mutaciones que causan deficiencia primaria en CoQ en 10 genes diferentes: *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ4*, *COQ5*, *COQ6*, *COQ7*, *COQ8A*, *COQ8B* y *COQ9* (Alcázar-Fabra et al., 2018). Estas mutaciones afectan a múltiples sistemas, como el SNC (incluyendo encefalopatía, convulsiones, ataxia cerebelar, epilepsia o incapacidad intelectual), SNP, riñones, músculo (debilidad, intolerancia al ejercicio), corazón (hipertrofia cardiomiopática), sistema sensorial (pérdida de audición, retinopatía o atrofia óptica). Sin embargo, debido al escaso número de pacientes con diagnóstico conocido

Eliana Barriocanal Casado

actualmente y el amplio rango de manifestaciones clínicas, es muy difícil establecer correlaciones genotipo-fenotipo y resulta complicado explicar por qué mutaciones en un mismo gen resultan en fenotipos clínicos distintos (Fig. 8). En este sentido, nuestro grupo caracterizó dos modelos de ratón con distintas mutaciones en el gen *Coq9*, estableciendo que el fenotipo observado en cada uno de ellos dependía de la estabilidad del complejo multiproteico de biosíntesis de CoQ, lo que suponía diferencias notables en los niveles de CoQ y en la estabilidad del supercomplejo I/III (García-Corzo et al., 2013; Luna-Sánchez et al., 2015); y recientemente hemos demostrado también que la acumulación de DMQ, o más concretamente el ratio DMQ/CoQ, puede tener consecuencias importantes en la manifestación del fenotipo (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019).

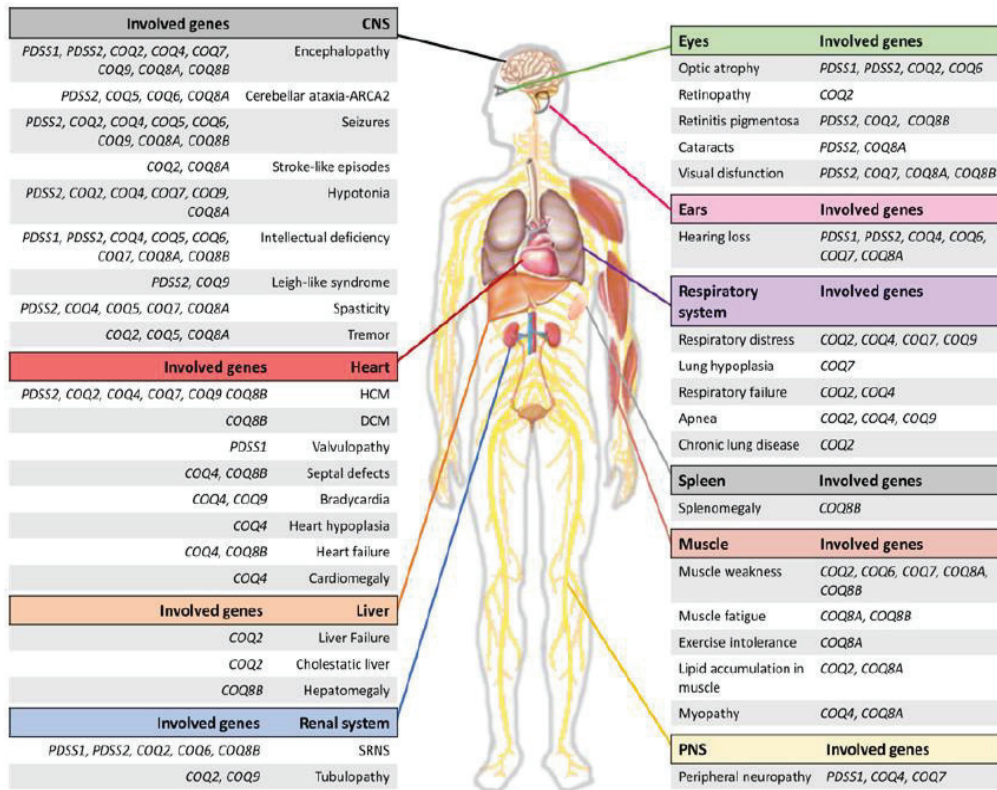


Figura 8. Órganos y sistemas afectados en individuos con deficiencia primaria en CoQ. (Alcázar-Fabra et al., 2018)

El modelo de ratón *Coq9*^{R239X} fue precisamente generado y caracterizado por nuestro grupo para entender mejor la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales en general, y la deficiencia en CoQ en particular. Este modelo presenta una mutación homocigota en el gen *Coq9* que es homóloga a la mutación R244X descrita en un paciente en el año 2009 por Duncan y colaboradores (Duncan et al., 2009), y que produce un codón de parada prematuro en el aminoácido 239, truncando los 75 aminoácidos terminales de la proteína COQ9. Esto hace que se produzcan ciertos niveles de una proteína

Eliana Barriocanal Casado

truncada debido a un ineficiente sistema NMD (degradación de mRNA mediada por mutaciones terminadoras, del inglés “*nonsense-mediated mRNA decay*”), que no es capaz de degradar completamente el mRNA mutado (Luna-Sánchez et al., 2015). La presencia de la proteína truncada desestabiliza el complejo multiproteico de síntesis de CoQ, de forma que los ratones *Coq9^{R239X}* presentan una deficiencia generalizada y severa (del 70-85%) en los niveles de CoQ con acumulación de DMQ. Su caracterización ha demostrado que: 1) la presencia de una proteína COQ9 disfuncional y/o el déficit de CoQ en cerebro causa un aumento del complejo III libre mitocondrial, conduciendo a un descenso de la respiración mitocondrial y síntesis de ATP; 2) la disfunción mitocondrial en cerebro induce daño oxidativo y muerte celular mediada por apoptosis independiente de caspasas; y 3) la forma encefalopática de la deficiencia en CoQ es progresiva y tiene lugar con muerte neuronal acompañada de astrogliosis reactiva severa y degeneración espongiiforme especialmente evidente en el tronco del encéfalo, lo que provoca reducción del peso corporal, parálisis de las extremidades entre los 3-7 meses de edad y muerte prematura por parada cardiorespiratoria (Fig. 9). Por tanto, los ratones *Coq9^{R239X}* muestran signos clínicos, histopatológicos, bioquímicos y moleculares de encefalopatía mitocondrial, representando un modelo excelente para probar terapias para enfermedades mitocondriales (García-Corzo et al., 2013).

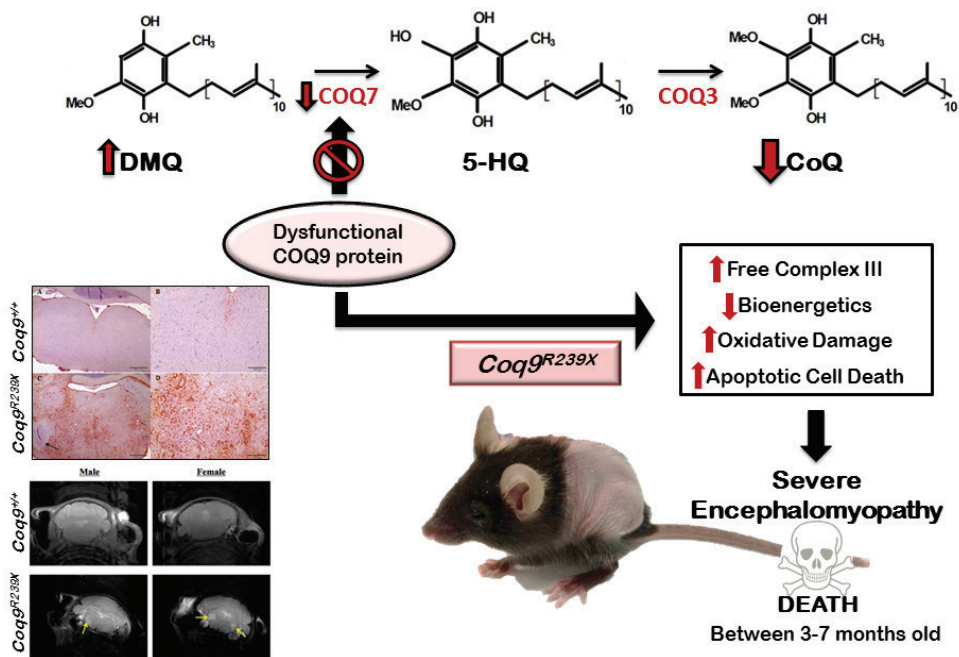


Figura 9. Modelo de ratón *Coq9^{R239X}* con deficiencia en CoQ.

Así, gracias a la ayuda de modelos celulares y animales, se están estudiando mecanismos fisiopatológicos asociados a la deficiencia en CoQ. Se cree que el déficit bioenergético y el incremento de especies reactivas del oxígeno derivados de la deficiencia en CoQ juegan un papel importante en la patología. Sin embargo, el amplio abanico de funciones de la CoQ, junto al desconocimiento del papel de algunas proteínas COQ de la ruta de biosíntesis y la considerable variabilidad de fenotipos clínicos sugieren la contribución de otros mecanismos patológicos. Quinzii y colaboradores demostraron en cultivos de fibroblastos de pacientes con mutaciones en *COQ2*, *PDSS2* y *COQ9* que mientras las deficiencias severas de CoQ (como ocurría en *PDSS2* y *COQ9*) conducían a profundos defectos en la producción de energía sin

Eliana Barriocanal Casado

apenas signos de estrés oxidativo, deficiencias más leves en los niveles de CoQ (*COQ2*) mostraban una reducción parcial de los niveles de ATP y un incremento significativo de la producción de ROS, acompañado de la oxidación de lípidos y proteínas y muerte celular (Quinzii et al., 2010). Además, como cabría esperar, la deficiencia en CoQ afecta a la síntesis de novo de pirimidinas, lo cual contribuye a la gravedad de la patología (López-Martín et al., 2007). Estudios en fibroblastos de pacientes con mutación en *COQ2* también han asociado la deficiencia en CoQ con un aumento de la mitofagia, proponiéndose como un mecanismo protector frente a la apoptosis por activación del poro de transición (Rodríguez-Hernández et al., 2009), aunque algunos autores lo han definido como algo perjudicial (Peng et al., 2015). Recientemente nuestro grupo y otros colaboradores también han propuesto la alteración en el metabolismo del sulfuro como un mecanismo fisiopatológico adicional en la deficiencia primaria en CoQ (Kleiner et al., 2018; Luna-Sánchez et al., 2017; Quinzii et al., 2017).

1.2.1.2 Deficiencia Secundaria en Coenzima Q

Los niveles de CoQ también pueden verse reducidos por otras causas secundarias no relacionadas directamente con mutaciones en genes de la biosíntesis de CoQ y, de hecho, estas deficiencias son más comunes que las primarias, probablemente debido a la diversidad de funciones biológicas y rutas metabólicas en las que está involucrada la CoQ, tanto en las membranas

mitocondriales como no mitocondriales (Yubero, Montero, Martín, et al., 2016).

Curiosamente, se ha descrito recientemente que la deficiencia secundaria en CoQ es una manifestación bastante frecuente en mutaciones de otros componentes del sistema OXPHOS (Kühl et al., 2017), y, de forma general, en otras enfermedades mitocondriales, especialmente en los síndromes con depleción del mtDNA (Montero et al., 2013; Quinzii & Hirano, 2011; Yubero, Montero, Martín, et al., 2016). Algunos ejemplos de patologías con deficiencia secundaria en CoQ que se han descrito en la literatura son: ataxia y apraxia oculomotora, causadas por mutaciones en el gen de la aprataxina (*APTX*) (Castellotti et al., 2011); acidemia glutárica tipo 2, debida a mutaciones en *ETFDH* (Gempel et al., 2007); síndrome cardiofaciocutáneo, por mutación del gen *BRAF* (Aeby et al., 2007); aciduria metilmalónica por mutaciones en *MUT* (Haas et al., 2009); deficiencia en el transportador de glucosa GLUT-1 por mutación en *SLC2A1* (Yubero et al., 2014); mucopolisacaridosis tipo III o síndrome de Sanfilippo (Yubero, Montero, O'Callaghan, et al., 2016); o atrofia multisistémica (Barca et al., 2016; Schottlaender et al., 2016); así como síndrome de Leigh asociado a deficiencia en una proteasa de la membrana mitocondrial interna con función desconocida, la proteasa PARL (Spinazzi et al., 2019). Asimismo, la deficiencia en CoQ se ha ligado recientemente al desarrollo de resistencia a la

Eliaana Barriocanal Casado

insulina en adipocitos humanos y de ratón como resultado de un incremento en la producción de ROS a través del complejo II (Fazakerley et al., 2018).

Aún se desconocen los mecanismos que subyacen al desarrollo de deficiencias secundarias en CoQ, aunque se ha propuesto que podría haber un aumento en la degradación de CoQ como consecuencia del daño oxidativo originado por una cadena respiratoria no funcional (en el caso de daños en la CRM); o que el descenso de CoQ puede deberse a interferencias con rutas de señalización involucradas en la biosíntesis de CoQ; o a una simple reducción en la estabilidad del complejo Q o a un deterioro general de la función mitocondrial. Incluso se ha reportado que la deficiencia en CoQ puede ser consecuencia de la administración de ciertos fármacos, como el tratamiento con estatinas para la hipercolesterolemia (Littarru & Langsjoen, 2007).

Sin embargo, no todos los pacientes con esas enfermedades desarrollan deficiencia en CoQ y no se sabe por qué algunos pacientes son más susceptibles que otros a la hora de desarrollarla, aunque algunos estudios apuntan a factores genéticos, como ciertos polimorfismos (Desbats et al., 2015; Vazquez Fonseca et al., 2018). Los síntomas de las deficiencias secundarias en CoQ varían en función de la patología original del paciente, aunque son frecuentes las manifestaciones musculares y neurológicas (debilidad muscular, hipotonía, intolerancia al ejercicio, mioglobinuria o ataxia).

Por tanto, desde el punto de vista del diagnóstico molecular, es necesario un análisis genético para diferenciar entre deficiencia primaria o secundaria en CoQ.

1.3 TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

El control de la función mitocondrial a través de dos genomas junto con la gran heterogeneidad de las manifestaciones clínicas hacen que el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades mitocondriales sea extremadamente dificultoso y complejo en la mayoría de los casos. El diagnóstico suele hacerse a través de tests genéticos, análisis bioquímicos en sangre, orina o líquido cefalorraquídeo y/o análisis histoquímicos y bioquímicos de biopsias de tejido e imágenes de resonancia magnética del cerebro, junto a la historia clínica del paciente y sus antecedentes familiares (Parikh et al., 2015).

De forma general, estas enfermedades no tienen cura y, desafortunadamente, actualmente las terapias se limitan al tratamiento de complicaciones que surjan en la evolución de la enfermedad y tratamientos paliativos basados en vitaminas y otros suplementos nutricionales, a pesar de que no existen muchas evidencias científicas que apoyen su efectividad (Kerr, 2013; Pfeffer, Majamaa, Turnbull, Thorburn, & Chinnery, 2012). El ejercicio también se ha visto que puede ser útil como terapia en algunas

Eliana Barriocanal Casado

enfermedades mitocondriales (Tarnopolsky, 2014). La mayoría de las estrategias están dirigidas a potenciar la función de la cadena de transporte de electrones y disminuir el estrés oxidativo a través de antioxidantes, que suelen ser las consecuencias más directas de la disfunción mitocondrial.

1.3.1 OPCIONES TERAPÉUTICAS ACTUALES

1.3.1.1 Estrategias farmacológicas. Suplementos dietéticos

Es muy frecuente el uso de vitaminas (como tiamina, riboflavina o ácido fólico), coenzima Q, aminoácidos (arginina), ácido lipoico y otros suplementos en pacientes con desórdenes mitocondriales, aunque no está aún bien estandarizado ni hay evidencias definitivas sobre su eficacia (Camp et al., 2016). La Sociedad de Medicina Mitocondrial recomienda empezar con un solo suplemento y evitar los “cócteles” al menos inicialmente (Parikh et al., 2015). Sin embargo, una encuesta llevada a cabo por el Consorcio Norteamericano de Enfermedades Mitocondriales reveló que en la práctica la mayoría de los pacientes toman un cóctel de al menos 4 suplementos (Karaa et al., 2016).

La mayoría de las vitaminas se utilizan principalmente por sus capacidades antioxidantes (tiamina, vitamina E, vitamina C). La riboflavina (vitamina B2) es un precursor de la flavoproteína y, por tanto, sirve como componente estructural de los CI y CII y cofactor de otras reacciones

Introducción

enzimáticas clave en la β -oxidación de ácidos grasos y el ciclo de Krebs. La acidemia glutárica tipo 2 debida a mutaciones en el gen *ETFDH* afecta a varias de estas reacciones enzimáticas y se ha visto que la riboflavina puede disminuir los síntomas y ralentizar la progresión de la enfermedad en algunos pacientes (Olsen et al., 2007). El ácido fólico está indicado en pacientes que tengan déficit o cuando hay síntomas neurológicos.

El ácido lipoico es un factor esencial de la piruvato deshidrogenasa y la cetoglutarato deshidrogenasa y es un potente antioxidante. Su uso en terapia es bastante común y, aunque ningún ensayo clínico lo ha probado como tratamiento único, una terapia combinada de creatina, CoQ y ácido lipoico mostró beneficios en distintos pacientes de enfermedades mitocondriales, disminuyendo los niveles de lactato en plasma y los marcadores de estrés oxidativo en la urina y atenuando la pérdida de fuerza muscular (Rodriguez et al., 2007).

La L-carnitina transfiere ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial interna hasta la matriz, donde son necesarios para la β -oxidación. Su uso está recomendado en los casos en los que exista un déficit, aunque suele darse en combinación con otras vitaminas (Parikh et al., 2015).

Eliana Barriocanal Casado

La L-arginina y L-citrulina actúan como precursores del óxido nítrico (que es un neurotransmisor y vasodilatador), cuya deficiencia se ha asociado a mecanismos patológicos en algunas enfermedades mitocondriales, como MELAS. Varios ensayos clínicos han mostrado que la arginina tiene efectos terapéuticos en pacientes de MELAS, ya que se cree que aumenta la vasodilatación intracerebral y el flujo sanguíneo de manera que previene de los episodios de accidentes cerebrovasculares (El-Hattab et al., 2012; Koenig et al., 2016; Koga et al., 2006; Koga et al., 2005; Koga et al., 2010)

La suplementación con ubiquinona o análogos de la misma (Idebenona, EPI-743) en las enfermedades mitocondriales es muy común por varios motivos: por un lado, se cree que podría reforzar la función mitocondrial; por otro, su función antioxidante podría hacer frente a cualquier incremento del estrés oxidativo; y, además, varios pacientes con distintas enfermedades mitocondriales desarrollan deficiencia secundaria en CoQ (Yubero, Montero, Martín, et al., 2016). En un ensayo clínico en pacientes con LHON la idebenona (un análogo sintético de cadena más corta y más soluble en agua) produjo una recuperación clínica relevante en uno de cada tres pacientes, de modo que ha sido aprobada recientemente para el tratamiento de LHON en Europa (Klopstock et al., 2013; Klopstock et al., 2011; Rudolph et al., 2013). Sin embargo, en un ensayo clínico en fase 2a en pacientes con MELAS no se han visto diferencias significativas. Varios ensayos en ataxia de Friedreich

también reportaron que la idebenona no producía beneficios terapéuticos (Di Prospero, Baker, Jeffries, & Fischbeck, 2007; Di Prospero, Sumner, et al., 2007; Lynch, Perlman, & Meier, 2010; Mariotti et al., 2003). El EPI-743, un análogo con mayor capacidad antioxidante gracias a la potenciación de la síntesis de glutatión, el cual es un importante antioxidante celular, está siendo analizado también en varios ensayos clínicos en pacientes con distintas enfermedades mitocondriales, entre ellas, pacientes con síndrome de Leigh, ataxia de Friedreich y pacientes muy graves. Sin embargo, un ensayo clínico en pacientes con síndrome de Pearson tuvo que finalizarse debido a que resultados de otros estudios no apoyaban su continuación (Hirano, Emmanuele, & Quinzii, 2018). Por tanto, de forma general no hay evidencias claras de que el uso de CoQ (o sus análogos) produzca beneficios en pacientes de enfermedades mitocondriales (salvo en pacientes con LHON). Sin embargo, hay una población de pacientes de enfermedades mitocondriales que sí podría beneficiarse directamente de este tratamiento, los pacientes con deficiencia primaria en CoQ. En estos casos las dosis deben ser superiores, de 5-50 mg/kg/día, y es crucial iniciar el tratamiento lo antes posible para limitar la progresión de la enfermedad y revertir algunas manifestaciones, aunque los daños en tejidos críticos como el riñón o el SNC son irreversibles (Montini, Malaventura, & Salviati, 2008). La respuesta al tratamiento con CoQ en estos pacientes es variable (Tabla 1).

Gen	Fams / Pacs.	Edad		Manifestaciones	Tratamiento con CoQ. Efectos
		Comienzo	Último Examen		
PDSS1	2/3	1 ^{os} años	1.5a* (1) 14-22a (2)	Encefalopatía (2), neuropatía periférica (2), atrofia óptica (2), sordera (2), síndrome nefrótico y ERT (1), valvulopatía (2)	NC
PDSS2	5/7	< 1a (6) 2a (1)	8m* (2) 8a*(1) 8-12a (2) NC (2)	Síndrome de Leigh (1), encefalopatía (1), ataxia cerebelosa (3), sordera (4), retinopatía (2), atrofia óptica (1), síndrome nefrótico (7), ERT (2), hipertrofia cardiomiopática (2)	Sí (2). Sin beneficios
COQ2	18/22	< 2a (15) 16-18a (2) 70 (1) NC (4)	< 2a* (9) 2-4a (5) 12a (1) 23-37a (2) 71a (1) NC (4)	Encefalopatía (7), atrofia cerebelar (1), MELAS (1), retinopatía (2), atrofia óptica (1), síndrome nefrótico (17), ERT (8), tubulopatía (1), debilidad muscular (1), hipertrofia cardiomiopática (3)	Sí (9). Sin beneficios (2). No deterioro (2). Mejora función renal (4). Mejora función neuromuscular (1)
COQ4	11/14	Nac. (13) 10m (1)	< 4d* (6) 1m-2a* (5) 3a (1) 18a (1) NC (1)	Encefalopatía (7), atrofia cerebelar (1), neuropatía periférica (1), sordera (1), miopatía (1), fallo cardiaco (2), hipertrofia cardiomiopática (7)	Sí (3). Sin beneficios (1). Mejora muscular (1). Mejora acidosis láctica y función cardiaca (1)
COQ5	1/3	Niñez (3)	14-22a (3)	Ataxia cerebelosa (3), atrofia cerebelar (1)	Sí (3). Mejora ataxia (3)
COQ6	19/26	< 1.5a (9) 2-6a (13) NC (4)	5-6a* (2) 17a* (1) NC* (2) 6m-11a (14) NC (7)	Ataxia cerebelosa (1), sordera (16), atrofia óptica (1), síndrome nefrótico (23), ERT (15), debilidad muscular (2),	Sí (4). Mejora proteinuria (3). Mejora función renal (1). Mejora retraso crecimiento (1)
COQ7	2/2	< 1a (2)	6-9a (2)	Neuropatía periférica (2), sordera (2), fallo renal (1), debilidad muscular (2), hipertrofia cardiomiopática (1)	Sí (2). No deterioro (2)
COQ9	3/6	Nac. (6)	Nac.* (2) 12h* (1) 3d* (1) 18d* (1) 2a* (1)	Encefalopatía (2), síndrome de Leigh (2), atrofia cerebelar (1), tubulopatía (1), hipertrofia cardiomiopática (1)	Sí (3). Sin beneficios (2). Reducción lactato plasma (1)
COQ8A / ADCK3	29/45	1-4a (24) 5-11a (13) 14-27a (8)	22a* (1) 26a* (1) 3-7a (2) 15-50a (40) 81a (1)	Atrofia cerebelar (44), ataxia cerebelosa (43), MELAS (6), encefalopatía (1), sordera (2), problemas visuales, miopatía (1), debilidad muscular (7), intolerancia al ejercicio (8), cardiomiopatía (1)	Sí (18). Sin beneficios (8). Mejora ataxia (4). Estabilización ataxia (1). Mejora capacidad motora (2). Mejora fatiga (1)
COQ8B / ADCK4	38/74	< 1-10a (29) 11-21a (38) 23-32a (7)	15a* (1) 25a* (1) 29a* (1) 1-9a (6) 10-20a (51) 21-39a (14)	Encefalopatía (1), convulsiones (4), síndrome nefrótico (63), ERT (45), enfermedad renal crónica (17), debilidad muscular (1), hipertrofia cardiomiopática (2), fallo cardiaco (1), cardiomiopatía (1)	Sí (28). Sin beneficios (7). Mejora proteinuria (17). Mejora fatiga (1). Estabilización función renal (1). NC (2)

Tabla 1. Deficiencia primaria en CoQ, manifestaciones asociadas y respuestas al tratamiento con CoQ. Fams: Familias; Pacs: Pacientes; NC:No conocido; a: años; m: meses; d: días; h: horas; Nac: nacimiento; El asterisco (*) indica muerte. ERT: enfermedad renal terminal.

1.3.1.2 Ejercicio

Se ha demostrado que el ejercicio es beneficioso en algunos pacientes de enfermedades mitocondriales (Tarnopolsky, 2014; Voet et al., 2013). El entrenamiento de resistencia puede aumentar la masa mitocondrial a través de la inducción de PGC-1 α , que es el principal regulador transcripcional de la biogénesis mitocondrial; así como la fuerza muscular y la actividad de enzimas antioxidantes y otras enzimas mitocondriales del músculo. Pacientes con miopatías mitocondriales por mutaciones en el mtDNA mostraron mejoras en la tolerancia al ejercicio y calidad de vida (Taivassalo et al., 2006; Taivassalo et al., 2001). No se han reportado efectos perjudiciales, de manera que se recomienda la práctica de ejercicio a los pacientes, aunque, ciertamente, a veces esta intervención presenta dificultades, especialmente en los pacientes con mayor intolerancia al ejercicio (Parikh et al., 2015).

1.3.2 TERAPIAS EMERGENTES

Dada la falta de evidencias clínicas y preclínicas sólidas sobre la eficacia de estos suplementos en muchos pacientes de enfermedades mitocondriales, en los últimos años la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas terapias. De esta manera se han propuesto distintas estrategias para para tratar estas enfermedades, ya sean “adaptadas” o “no adaptadas”, esto es: 1) terapias específicas para determinados defectos, como

Eliana Barriocanal Casado

la eliminación de compuestos tóxicos que se acumulan (como el uso de N-acetil cisteína y metronidazol para disminuir los niveles de H₂S en la encefalopatía etilmalónica (Viscomi et al., 2010)), o la suplementación con desoxinucleósidos y desoxinucleótidos cuando existen desequilibrios en el pool de nucleótidos (como dC o dCMP y dT o dTMP en el modelo de ratón *Tk2^{H126N}*) (Garone et al., 2014; Lopez-Gomez et al., 2017), o el uso de análogos de precursores de la biosíntesis de CoQ para las deficiencias primarias en CoQ (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019; Wang, Oxer, & Hekimi, 2015); o 2) terapias que actúan sobre rutas comunes y que, al menos teóricamente, pueden ser relevantes en diferentes enfermedades mitocondriales, como la estimulación de la biogénesis mitocondrial (usando por ejemplo compuestos que actúan sobre la ruta de PGC-1 α (Cerutti et al., 2014; Khan et al., 2014; Viscomi et al., 2011)), o la hipoxia, con el fin de producir un cambio en la dependencia del sistema OXPHOS para la bioenergética celular (Jain et al., 2016).

1.3.2.1 Inhibición de mTORC1

Una de las opciones terapéuticas con gran potencial en las enfermedades mitocondriales que surgió hace unos años es la modulación de las vías de señalización reguladas por un complejo con actividad quinasa llamado “*mechanistic target of rapamycin complex 1*” (mTORC1). En el año 2013, Johnson y colaboradores demostraron que la administración crónica de una

dosis alta de rapamicina (8 mg/kg/día), un compuesto que inhibe mTORC1, retrasaba la aparición y progreso de los síntomas neurológicos en un modelo de ratón con síndrome de Leigh y deficiencia en complejo I por ausencia de la subunidad NdufS4 (*Ndufs4*^{-/-}), consiguiendo unos resultados sorprendentes sobre la supervivencia (S. C. Johnson et al., 2013). mTORC1 forma parte del núcleo central de señalización celular que integra señales intra- y extracelulares de disponibilidad de nutrientes para regular y coordinar varios procesos celulares, como la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos, la autofagia y el metabolismo celular (Saxton & Sabatini, 2017). Mientras que su modulación se ha tratado ampliamente como forma de aumentar la supervivencia en estudios de envejecimiento, la nueva conexión establecida con las enfermedades mitocondriales ampliaba la visión tradicional de las rutas de señalización, lo cual podía tener implicaciones terapéuticas importantes. Sin embargo, el mecanismo por el cual la rapamicina retrasaba el progreso de la enfermedad en el modelo de ratón no estaba claro, ya que ninguna de las rutas que evalúan los autores mostraba resultados convincentes y, curiosamente, no se corregía la deficiencia mitocondrial de los ratones mutantes tratados (S. C. Johnson et al., 2013). Además, el trabajo dejaba abiertas otras dos cuestiones importantes en relación a un posible uso de la rapamicina como tratamiento general en las enfermedades mitocondriales: por un lado, la dosis de rapamicina que utilizan en el estudio

Eliana Barriocanal Casado

es muy elevada y no se sabe si la rapamicina sería efectiva en dosis equivalentes a las usadas en los ensayos clínicos en humanos, que son mucho más bajas con el fin de evitar posibles efectos secundarios; por otro, al no identificar el mecanismo que produce la mejora, se plantea la duda de si la inhibición de mTORC1 sería útil únicamente en los casos de mutaciones en *NDUFS4*, en todos los casos de deficiencia en complejo I, o en los casos de síndrome de Leigh, o, dado que el déficit bioenergético no se corrige, en todos los casos de enfermedades mitocondriales.

1.3.2.2 Terapia Génica

La posibilidad de re-expresar la forma *wild-type* de un gen mutado se ha convertido en una esperanza muy atractiva para muchas enfermedades genéticas de carácter monogénico, de modo que también ha cobrado fuerza en los últimos años como estrategia para el tratamiento de las enfermedades mitocondriales. Así, en un modelo doble *knockout* de encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE), *Tymp/Upp1*, el grupo del Dr. Ramón Martí fue capaz de conseguir una elevada actividad de la enzima defectuosa, la timidina fosforilasa (TP), en sangre tras un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCs) modificadas genéticamente con lentivirus para sobreexpresar el gen *Tymp wild-type* (Torres-Torronteras et al., 2011). No obstante, para muchas enfermedades mitocondriales, incluyendo las deficiencias en CoQ₁₀, el objetivo sería corregir el defecto en

tejidos diana incluyendo cerebro. En este sentido, esta misma estrategia de trasplante de HSCs modificadas por terapia génica (HSCs-GT) se ha usado en la leucodistrofia metacromática (MLD) debida a mutaciones en el gen *Arsa*. Así, en el modelo animal de esta enfermedad (*Arsa*^{-/-}) se demostró que las HSCs corregidas sobreexpresando la proteína ARSA (arilsulfatasa A) trasplantadas eran capaces de diferenciarse a microglía y que esta microglía en el SNC era capaz de donar la proteína terapéutica sobrante a otras células del SNC, incluyendo neuronas y corrigiendo de esta manera el fenotipo clínico de leucodistrofia (Biffi et al., 2006). En este estudio detectaron la proteína ARSA corregida donante en el interior de las neuronas de los ratones *Arsa*^{-/-} receptores, demostrando que estaba teniendo lugar una transferencia de la proteína *wild-type* desde la microglía (derivada de las HSCs transducidas trasplantadas) a las neuronas. Los ensayos clínicos que siguieron a estos resultados incluyeron a pacientes con MLD severa en edades muy tempranas y con una esperanza de vida inferior a los 10 años. Los beneficios terapéuticos conseguidos fueron impresionantes y nunca anteriormente logrados en este tipo de patologías. La mayor parte de los niños tuvieron desarrollos cognitivos y motores normales, al menos hasta el momento de la publicación de los datos (con un seguimiento de hasta 4 años y medio) (Biffi et al., 2013; Sessa et al., 2016). Cabe destacar que la necesidad de la sobreexpresión de la proteína o enzima deficiente es un aspecto importante

en muchos casos, ya que el trasplante alogénico de células madre de donantes sanos no siempre consigue mitigar los síntomas asociados a la enfermedad, especialmente cuando la enfermedad se desarrolla en las primeras etapas de la vida (Sessa et al., 2016). Así, se definen tres aspectos fundamentales para el éxito de esta estrategia: 1) Alta sobre-expresión: las células diferenciadas a partir de las HSCs deben de expresar niveles muy altos de la proteína terapéutica. 2) Alta repoblación: los tejidos afectados por la patología han de repoblarse eficazmente con las células derivadas de las HSCs expresando la proteína terapéutica. 3) Eficiente cross-corrección.: la proteína expresada por las células infiltradas en los tejidos ha de ser capaz de transferirse a las células de los tejidos diana.

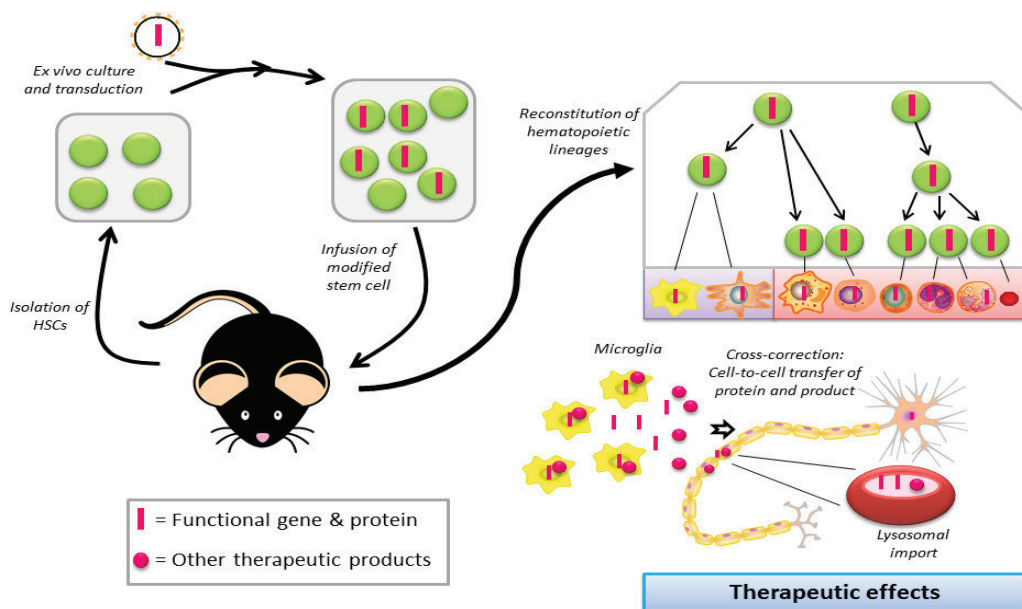


Figura 10. Estrategia de terapia génica *ex vivo* en modelos de enfermedad lisosomal.

Otra estrategia que está siendo muy explotada en los últimos años es el uso de vectores virales adenoasociados (AAVs), ya que suponen un método de administración de la proteína o enzima terapéuticas particularmente atractivo por su favorable perfil de seguridad (se mantienen en estado episomal, reduciendo por tanto los riesgos que supone la integración en el genoma), el mantenimiento de la expresión durante largos períodos de tiempo y la disponibilidad de distintos serotipos con tropismos hacia diferentes tejidos. De esta manera se han llevado a cabo varias estrategias de terapia génica con AAVs portadores del gen terapéutico en distintos modelos de ratón de enfermedad mitocondrial. El primero de ellos fue reportado en 2005 en un modelo de miopatía mitocondrial por deficiencia en una proteína translocadora de ATP a través de la membrana mitocondrial interna, el ratón *Ant^{-/-}*, en el cual inyectaron vectores AAV2 portando la proteína ANT1 intramuscularmente obteniendo buenos resultados (Flierl, Chen, Coskun, Samulski, & Wallace, 2005). Gracias a la existencia de serotipos de AAVs con diferentes tropismos y a la posibilidad de usar promotores tejido-específicos, esta estrategia ha sido muy útil en modelos de MNGIE y encefalopatía etilmalónica (EE), ambos caracterizados por la acumulación de compuestos tóxicos (timidina y desoxiuridina en el caso de MNGIE, y H₂S en EE). En ambos modelos se han usado vectores virales adenoasociados AAV2/8 con el gen terapéutico (*TYMP* y *ETHE1*, respectivamente) bajo el

Eliana Barriocanal Casado

control del promotor hepático TBG, resultando en una eficiente transducción de los hepatocitos (gracias al tropismo del serotipo 8) y una expresión sólida y estable de la enzima terapéutica en el hígado, que es el primer y principal tejido detoxificador de compuestos potencialmente dañinos en circulación, mejorando con ello el fenotipo clínico (Di Meo et al., 2012; Torres-Torronteras et al., 2014). La potencialidad de los AAVs se ha utilizado también recientemente en ensayos de edición génica para casos de mutaciones en el mtDNA, bien sea para la producción de partículas víricas con nucleasas zinc-finger de diana mitocondrial (Gammage et al., 2018) o mitoTALENS (Bacman et al., 2018). El éxito de estas terapias plantea la posibilidad del uso de estos vectores en otras enfermedades mitocondriales y, de hecho, hay varios ensayos clínicos en marcha para pacientes con LHON, aunque podrían plantearse dificultades en enfermedades multisistémicas y especialmente aquellas que involucran el SNC.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las enfermedades mitocondriales constituyen un conjunto muy heterogéneo de enfermedades genéticas con distinto grado de severidad y que pueden afectar cualquier órgano o tejido. A día de hoy no existe cura para la mayoría de estas enfermedades y los tratamientos se limitan a cuidados paliativos basados en distintos suplementos o intervenciones en caso de complicaciones. Esta situación ha llevado a la comunidad científica a plantear distintas estrategias en busca de nuevos tratamientos que, o bien sean efectivos para varias de estas enfermedades, buscando incidir sobre el problema metabólico; o bien que sean efectivas para un grupo de pacientes particular, solucionando, por ejemplo, el defecto genético que causa la patología mediante terapia génica. En esta tesis se han abordado ambas estrategias basándonos en dos hipótesis principales:

Intervención metabólica. Estudios previos demostraron que altas concentraciones de rapamicina producen efectos terapéuticos importantes en un modelo de encefalopatía mitocondrial asociada a la deficiencia en complejo I (*Ndufs4*^{-/-}). En esta línea, nuestra primera hipótesis es que dichos efectos terapéuticos están mediados por mTORC1 y que los beneficios de intervenir en esta ruta podrían ser extensibles a otras enfermedades mitocondriales, como es la encefalopatía mitocondrial asociada a la

Eliana Barriocanal Casado

deficiencia en CoQ, recapitulada en el modelo de ratón $Coq9^{R239X}$. Para abordar esta línea de investigación nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Evaluar si la administración rapamicina a dosis altas y/o bajas presenta efectividad terapéutica en los ratones $Coq9^{R239X}$.

2. Evaluar las vías de señalización “*downstream*” de mTORC1 como posibles dianas terapéuticas.

Terapia génica. La introducción de material genético en tejidos o células ha conseguido beneficios terapéuticos allí donde otras estrategias no lo han logrado, incluyendo enfermedades que involucran el SNC. En esta dirección, nuestra hipótesis es que es posible curar diferentes enfermedades mitocondriales mediante la expresión de los genes que la causan. Para corroborar esta hipótesis nos centraremos en el modelo murino de encefalopatía mitocondrial causada por deficiencia en CoQ y en dos estrategias de terapia génica. Para ello abordaremos los objetivos siguientes:

3. Desarrollar una estrategia *ex vivo* para el tratamiento de ratones $Coq9^{R239X}$ mediante la inoculación de células mHSCs sobreexpresando $Coq9$.

4. Desarrollar una estrategia *in vivo* para el tratamiento de ratones $Coq9^{R239X}$ mediante la administración intravenosa de vectores adenoasociados expresando $Coq9$.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 CONSTRUCCIÓN Y PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES

Los plásmidos CCoq9WP LV y SCoq9WP se construyeron mediante técnicas de clonación estándar utilizando las enzimas de restricción PstI/BamHI (New Englan Biolabs) para reemplazar el gen eGFP por el cDNA de *Coq9* (obtenido por síntesis génica procedente de Genscript) en los esqueletos CEWP (con promotor CMV) y SEWP (con promotor *ssfv*), respectivamente (Benabdellah, Cobo, Muñoz, Toscano, & Martin, 2011).

Los vectores lentivirales fueron producidos por co-transfección de células HEK 293T con tres plásmidos: 1- Plásmido vector (CEWP o SEWP con eGFP; o bien, CCoq9WP o SCoq9WP con *Coq9*) producidos a gran escala mediante un kit para maxi-producción de plásmidos libres de endotoxinas (EndoFree Plasmid Maxi Kit; Qiagen); 2- Plásmido de empaquetamiento pCMV Δ R8.9 y 3- Plásmido de la envuelta pMD.G, en proporción 3:2:1, respectivamente, como se ha descrito previamente (Benabdellah et al., 2011; Zufferey, Nagy, Mandel, Naldini, & Trono, 1997). Para garantizar un crecimiento exponencial de las células empaquetadoras HEK 293T, se tripsinizaron 48 horas antes de la transfección y se plaquearon al día siguiente en placas Petri de 10cm de diámetro buscando obtener un 80-90% de

Eliana Barriocanal Casado

confluencia el día de la transfección. Los tres plásmidos con los que se co-transfectaron las 293T se resuspendieron en medio DMEM sin suero y se mezclaron con LipoD293™ (SignaGen Laboratories). Las 293T se incubaron 5 horas con la mezcla y se les cambió el medio por medio DMEM completo. A partir de ahí, los sobrenadantes que contenían las partículas virales se recogieron en distintos momentos con el fin de obtener el máximo rendimiento: a las 24h (1ª recogida) a las 36h (2ª recogida) y a las 48h (3ª recogida). Las partículas virales se congelaron o concentraron mediante filtración a 2000 g y 4°C con filtros concentradores de 100 Kd (Amicón Ultra, Millipore), o mediante ultracentrifugación a 23.000 rpm, 2h a 4°C.

La titulación del vector se estimó en células K562, incubando 10^5 células con 0,1 μ l, 1 μ l y 10 μ l del sobrenadante viral. Las células transducidas se lisaron y se extrajo el DNA 7-10 días después de la transducción. El número de copias del vector por célula (vcn/c) se determinó por qPCR usando una pareja de *primers* de una zona del esqueleto del vector lentiviral: WPRErev: 5'-cggaattgtcagtgccaaca-3' y WPREfw: 5'-ggtgtgcactgtgttgctga-3'), y una curva estándar de diluciones seriadas del plásmido CEWP (desde 10^2 hasta 10^6 copias). El título (unidades de transducción/ml) se estimó teniendo en cuenta el vcn/c calculado, el volumen viral utilizado y el número de células inicial (10^5).

3.2 MODELOS CELULARES

3.2.1 FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS

Se utilizaron fibroblastos embrionarios previamente aislados de ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{R239X}*. Se crecieron en medio completo: DMEM-GlutaMAX rico en glucosa suplementado con 10 % de FBS, 1% de aminoácidos no esenciales MEM y 1% de antibiótico/antimicótico, a 37°C y 5% CO₂. Para su transducción se sembraron 50-100.000 células en placa de 24 pocillos y se expusieron a distintos volúmenes del vector lentiviral durante 5 horas para lograr las multiplicidades de infección (MOI) deseadas. Pasadas las 5 horas de incubación se cambió el medio y se mantuvieron en cultivo de 7 a 20 días.

3.2.2 CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS DE RATÓN

3.2.2.1 Aislamiento de mHSCs de ratones donantes

La médula ósea se aisló de ratones donantes de 4-6 semanas de edad (*Coq9^{+/+}* o *Coq9^{R239X}*). Se recogieron las células de la médula ósea de los ratones donantes sacrificados por asfixia con CO₂ seguido de dislocación cervical, extrayéndose de los 2 fémures y 2 tibias en condiciones estériles. Se pasaron a través de un filtro de células de 40 µm y se trató con una solución de cloruro de amonio. (Stem Cell Technologies) para eliminar los glóbulos rojos. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-Ly-6A / E (Sca-1) -PE para

Eliana Barriocanal Casado

ratón (eBioscience, San Diego, CA), se lavaron con buffer AutoMACS y se incubaron con bolas magnéticas (*microbeads*) anti-PE (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la separación magnética utilizando AutoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec), se obtuvo la fracción de células madre hematopoyéticas Sca-1 positivas.

3.2.2.2 Cultivo y transducción de mHSCs

Las células aisladas se cultivaron a 37°C y 5% CO₂ en medio completo StemSpan serum-free (Stemcell) suplementado con 1% FBS, 1% penicilina/estreptomicina y un cóctel de citoquinas: 20 ng/ml m-IL3; 20ng/ml m-IL6; 20ng/ml m-Flt3-L; 100 ng/ml m-SCF, a una densidad inicial de 1-5 x 10⁶ células/ml el día del aislamiento, pasando a una densidad de 3 x 10⁵ células/ml para la expansión.

La transducción se hizo el mismo día del aislamiento, dejando entre 1 y 2 horas de reposo tras el aislamiento e incubándose posteriormente con las partículas lentivirales a una MOI de 100-200 durante toda la noche. Al día siguiente se cambiaron de medio y se mantuvieron en cultivo o se lavaron y se recogieron para su inoculación en los ratones.

3.3 MODELO ANIMAL. GRUPOS EXPERIMENTALES Y TRATAMIENTOS

Se utilizaron ratones $Coq9^{R239X}$ con fondo genético mezcla de C57BL/6N y C57BL/6J generados y caracterizados previamente en nuestro laboratorio (García-Corzo et al., 2013; Luna-Sánchez et al., 2015). Se cruzaron ratones heterocigotos $Coq9^{R239X/+}$ dando lugar a una distribución mendeliana de ratones *wild-type* ($Coq9^{+/+}$), heterocigotos ($Coq9^{+/R239X}$) y homocigotos mutantes ($Coq9^{R239X/R239X}$, nombrados como $Coq9^{R239X}$). Se seleccionaron únicamente homocigotos *wild-type* y homocigotos mutantes para llevar cabo los experimentos y se distribuyeron aleatoriamente en los grupos experimentales. Los datos también fueron recolectados y procesados al azar.

Los animales se estabularon en el servicio de experimentación animal del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, en zona libre de patógenos SPF y bajo un ambiente controlado de fotoperiodo (un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad) y temperatura (22°C). El acceso al agua y al pienso fue continuo durante todos los experimentos. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Granada (procedimientos CEEA 2014-74 y 2015-92) y en concordancia con el Convenio Europeo para la Protección de Animales Vertebrados utilizados

Eliana Barriocanal Casado

en la Experimentación y con Otros Fines Científicos (CETS # 123) y las normas de experimentación animal en España establecidas en el RD53/2013.

3.3.1 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

La rapamicina se obtuvo comercialmente de LC Labs (Woburn, MA). Para su preparación en el pienso, la rapamicina fue previamente microencapsulada con un material de recubrimiento resistente a las enzimas del estómago, Eudragit S100, permitiendo una apropiada difusión de la droga (Harrison et al., 2009). El pienso estándar para ratones se trituró hasta obtener un polvo y se mezcló con la rapamicina microencapsulada a una concentración de 28 o 225 ppm. Se agregaron 300 ml de agar fundido al 1% en agua estéril por kilogramo de pienso en polvo, y la mezcla se sedimentó y se coció a 55°C durante 2–3 h para endurecerlo. Los pellets se almacenaron a 4°C (almacenamiento a corto plazo) o –20°C (almacenamiento a largo plazo). El pienso control no contenía fármaco, sino únicamente el material de microencapsulación (Eudragit S100) a unas concentraciones iguales a la de la comida con rapamicina.

La trehalosa se administró en el agua de bebida a una concentración del 2% (p/v), renovándose 2-3 veces por semana (X. Zhang et al., 2014).

El tratamiento con PF-4708671 se administró mediante inyección intraperitoneal diaria a una concentración de 35 mg/kg/día (Di et al., 2012).

El fármaco se disolvió a 5 mg/ml en PEG400 al 40%, PG al 27,5% y Tween80 al 0,25% en PBS. Este vehículo sin PF-4708671 también se inyectó en ratones *Coq9^{R239X}* como control.

Los ratones comenzaron a recibir los tratamientos asignados a la edad de 1 mes y se sometieron a eutanasia a los 3 meses de edad para los ensayos experimentales.

El peso corporal se recolectó durante todo el tratamiento, antes de comenzar (0 meses) y a 1 y 2 meses después del tratamiento (lo que corresponde a 1, 2 y 3 meses de edad). La coordinación motora se evaluó mediante la prueba de rotarod registrando el tiempo que los ratones podían permanecer en la barra sin caerse ("*latency to fall*") hasta un máximo de 300 segundos (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019).

3.3.2 TERAPIA GÉNICA

3.3.2.1 Terapia celular-génica con mHSCs

El trasplante de células madre hematopoyéticas de ratón (mHSCs) transducidas o no con vectores lentivirales se realizó mediante inyección en la vena de la cola de ratones de un mes de edad, tras un régimen de ablación de la médula ósea con busulfán inyectado intraperitonealmente a una dosis final de 100 o 125 mg por kg de ratón repartida en 4 o 5 días respectivamente

Eliana Barriocanal Casado

(25 mg/kg/día) (Wilkinson et al., 2013). Los ratones fueron tratados con el antibiótico Enrofloxacin en el agua de bebida (10 mg/100 ml) unos días antes de iniciar la ablación con busulfán, y se mantuvo hasta 3 semanas después de la inoculación de las células, renovándose 2-3 veces por semana. Se inocularon entre $3-5 \times 10^5$ células en un volumen de 100 μ l de PBS estéril en un plazo entre 16 y 24 horas después de la última inyección con busulfán. La inyección de las células en la vena de la cola se realizó con jeringas de insulina de 29G estériles (BD-Microfine +), con ayuda de un retenedor para ratones y una lámpara de infrarrojo para dar calor a los animales con el fin de calmarlos y dilatar los vasos de la cola del ratón antes del trasplante.

El busulfán se preparó en un stock a 6mg/ml en una mezcla de 33% de N,N-dimetil-acetamida (DMA) y 67% de polietilenglicol 400 (PEG400), y fue guardado a 4°C durante los días de tratamiento. Se comprobó el efecto del vehículo sin busulfán sobre la mortalidad y la depleción del sistema hematopoyético a una dosis correspondiente a la dosis de 125 mg/kg.

Los ratones se sacrificaron a los 4-5 meses de edad para su evaluación.

3.3.2.2 Terapia génica con vectores virales adenoasociados

Los vectores ssAAV9-CAG-*Coq9* (de cadena simple) fueron desarrollados en el laboratorio de la Dra. Gloria González Aseguinolaza de la Universidad de Navarra, con un título de $1,57 \times 10^{12}$ pv/ml. La inoculación de estos

vectores se hizo también de forma sistémica por la vena de la cola en ratones *Coq9*^{R239X} de un mes de edad siguiendo las mismas pautas que en la inyección de las mHSCs. Los ratones se sacrificaron 4 meses de edad. En base a ese título de vectores, establecimos 2 dosis de administración diferentes: 3×10^{10} y 2×10^{11} pv/ratón.

3.4 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

En las células, se aisló el RNA total del pellet celular utilizando un kit comercial (Real total RNA spin plus) siguiendo las instrucciones del fabricante. En sangre extraída de la vena facial de los ratones la extracción se hizo siguiendo el protocolo de TRI Reagent Solution de Applied Biosystems.

Se verificó su integridad a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Se utilizaron 200 ng de RNA total para llevar a cabo la retrotranscripción usando un kit para retrotranscripción “*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” (Applied Biosystems). Con el cDNA obtenido se llevó a cabo una PCR cuantitativa a tiempo real utilizando el termociclador Mx3005P Stratagene (Agilent Technologies). Las reacciones de PCR se hicieron utilizando la master mix “*TaqMan Gene Expression Master Mix*” (Applied Biosystems) y las sondas Taqman para *Coq9* y *Hprt* de ratón. Se analizó la expresión de *Coq9* y los resultados se normalizaron por el

Eliana Barriocanal Casado

control endógeno *Hprt* (normalizador) y se refirieron frente a los valores en las muestras *wild-type* (calibrador).

3.5 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO Y CÉLULAS Y ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Los análisis de western blot de tejido se hicieron en homogenado de cerebro, hígado, riñones y corazón. Las muestras se homogenizaron en el tampón comercial T-PER[®] (Thermo Scientific) con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa también comercial (Thermo Scientific, #78440) con ayuda de un homogeneizador de cristal-teflón a 1.100 rpm. El homogenado se sonicó y centrifugó a 1.000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante resultante se usó para el análisis de western blot.

Para el análisis de proteínas por western blot en células, éstas se recogieron, se lavaron con PBS y se lisaron utilizando RIPA Lysis Buffer (Amresco) junto a un cóctel de inhibidores de proteasas y EDTA (Thermo Scientific) durante 30 minutos a 4°C en agitación. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min (4°C) y nos quedamos con el sobrenadante.

Se cargaron entre 20-60 µg de proteína de cada muestra y se corrieron en geles prefabricados Mini-PROTEAN TGX[™] del 4-15 % (Bio-Rad), a 200V durante 40 minutos. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF-0,45 µm mediante el sistema mini Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad) o

Trans-Blot SD Transfer Cell (Bio-Rad) y se hibridaron con anticuerpos específicos de las proteínas de interés durante toda la noche.

Para poder detectar la proteína COQ9 se llevó a cabo un procedimiento especial. Se cargaron 35µg de proteína de los homogenados celulares, previamente procesados con tampón de carga XT y el agente reductor XT (Bio-Rad). Posteriormente se realizó la electroforesis en geles Criterion™ XT de 10% (Bio-Rad) usando la solución de electroforesis MOPS y el sistema electroforético de Criterion Cell (Bio-Rad), a 200V 1h. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF-0,45 µm mediante el sistema de transferencia húmedo sin SDS y se incubaron con el anticuerpo durante toda la noche.

La interacción proteína-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent) (GE Healthcare. Buckingham-shire, UK). La cuantificación de las bandas se realizó en un escáner Image Station 2000R (Kodak, Spain) y el software usado fue Kodak 1D 3.6. La intensidad de las bandas obtenidas se normalizó con respecto a GAPDH o VDAC1 y los datos se expresaron en relación a un control *wild-type Coq9^{+/+}*.

Los anticuerpos utilizados en tejido fueron: anti-phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (Cell Signaling, 4856S), anti-S6 Ribosomal Protein (Cell Signaling, 2217S), anti-SQSTM1/p62 (Proteintech, 18420-1-AP), anti-

Eliana Barriocanal Casado

LC3 (Novusbio, NB100-2220), y anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-166574). Para las células se utilizaron los anticuerpos anti-COQ9 (ThermoFisher Scientific, PA5-24816), anti-COQ7 (Proteintech, 15083-1-AP) y anti-VDAC1 (Abcam, ab14734).

3.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CoQ

La determinación de los lípidos CoQ₉, CoQ₁₀ y/o DMQ se llevó a cabo mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés “*high performance liquid chromatography*”) acoplada a un detector electroquímico (HPLC-EQ) (López et al., 2010). Los resultados se expresaron en ng lípido/mg proteína.

La extracción de las quinonas se realizó a partir de 10-40 mg de tejidos. Todas las muestras se homogenizaron en 350 µl de agua miliQ a 1.100 rpm con un homogeneizador de cristal-teflón (Stuart Scientific). El homogenado obtenido se sonicó (Sonuplus HD-2070) para romper las membranas mitocondriales y se transfirieron 50 µl de este homogenado a un eppendorf con 950 µl de 1-propanol. La mezcla resultante se agitó durante 2 minutos en “vortex” y se centrifugó a 11.300 g durante 5 minutos. Para la determinación cromatográfica se utilizaron 200 µl del sobrenadante obtenido y se transfirieron a un vial de HPLC para su inyección (en algunos tejidos fue

necesario realizar una dilución adicional con 1- propanol). Las proteínas se midieron por Bradford en el resto del homogenado.

En las células, se partió de un pellet celular, el cual se resuspendió en agua miliQ, y se transfirió a un tubo de vidrio con tapón de rosca con 1 ml de SDS 0,1 M, reservando una alícuota para la medida de proteínas por Bradford. Tras agitar brevemente la mezcla se añadió 1 ml de etanol y 2 ml de hexano, se agitó durante 2 min en vortex (rompiendo así las membranas mitocondriales) y se centrifugó a 2.000 g durante 5 min. La fase superior resultante, que contiene las quinonas y el hexano, se transfirió a un vial de centelleo con pipetas Pasteur de vidrio (con cuidado de no coger nada de la fase inferior). A la fase inferior que queda en el tubo de vidrio se le añadió 2,5 ml de hexano, se agitó en vortex durante 1 min y se volvió a centrifugar a 2.000 g durante 5 min. La fase superior resultante se transfirió al mismo vial de centelleo con pipetas Pasteur de vidrio sumándose así a la anterior y el extracto de hexano se evaporó con un flujo leve de Nitrógeno en estado gaseoso. Finalmente, se añadió 150 µl de 1-propanol al tubo de centelleo con el residuo lipídico, mezclándose con agitación suave y se transfirió a un vial de HPLC para su inyección.

3.7 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR Y MEDIDA DE LAS ACTIVIDADES DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS DEPENDIENTES DE CoQ

Tras sacrificar a los animales, se extrajeron rápidamente cerebro y riñón, se lavaron en solución salina y se homogenizaron en un homogeneizador de cristal-teflón. Los riñones se homogenizaron (1:4 p/v) en medio de homogenización A (0,32 M sacarosa, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4), y el cerebro en medio de homogenización A con albúmina libre de ácidos grasos al 0,2% (1:5 p/v). Ambos tejidos se homogenizaron a 600 rpm. Todo el proceso se realizó en hielo para mantener una temperatura de 4°C. Los homogenados obtenidos se centrifugaron a 1.000 g durante 5 minutos a 4°C para eliminar la fracción nuclear y los debris celulares. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 14.400 g durante 2 minutos a 4° C (2 veces) y se obtuvo el pellet mitocondrial. El pellet mitocondrial se almacenó a -80°C para su posterior uso.

La actividad de los complejos respiratorios dependientes de CoQ (CI+III y CII+III) se realizó en partículas submitocondriales. Para su obtención, el pellet mitocondrial (100 µg de proteínas) se resuspendió y sonicó en 100 µl de buffer fosfato potásico 0,1 M, pH 7.5. La medida de la actividad del complejo I+III se basa en la reducción del citocromo C y se midió a 30°C en presencia del buffer de reacción específico compuesto por: 0,5 mM KCN

(inhibidor del CIV), 0,2 mM NADH (sustrato para el CI) y 0,1 mM citocromo C a 550 nm tal y como se ha descrito previamente (García-Corzo et al., 2013; Kirby, Thorburn, Turnbull, & Taylor, 2007). Para la actividad del complejo II+III se utilizó el buffer de reacción compuesto por 0,5 mM KCN, 0,3 mM de succinato (sustrato para el CII) y 0,01mM de rotetona (inhibidor del CI). La medida de la actividad se inició con la adición de 0,1 mM citocromo C y se monitorizó su reducción por el complejo III mediante el descenso en la absorbancia a 550 nm (Kirby et al., 2007). Los resultados se obtuvieron, en ambas actividades, como nmol cyt c red/min/mg proteína y se expresaron en porcentaje en relación al *wild-type*.

3.8 MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN TEJIDO

Para medir la respiración mitocondrial, es necesario que las mitocondrias estén frescas e intactas. Por ello, tras sacrificar a los animales, se extrajeron en hielo rápidamente los riñones y el cerebro.

El cerebro se homogenizó en 4 ml de buffer de aislamiento C (320 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.4) a 500 rpm y 4°C en un homogeneizador de cristal-teflón. El homogenado se centrifugó a 13.000 g, 3 minutos a 4°C, y el sobrenadante se reservó en un nuevo tubo (S1) en hielo. El pellet se resuspendió cuidadosamente en 5 ml de buffer de aislamiento A (250 mM sacarosa, 0.5 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris y 1% albúmina libre de

Eliana Barriocanal Casado

ácidos grasos, pH 7.4) y se centrifugó a 13.000 g durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante (S2) se combinó con el sobrenadante S1 y la mezcla se centrifugó a 21.200 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet mitocondrial resultante se resuspendió en buffer A con un 15% de Percoll y se llevó a tubos de ultracentrífuga con un gradiente de Percoll formado por 1ml de Percoll 40% y 1 ml de Percoll 23% en buffer A, y se centrifugó a 63.000 g durante 30 minutos a 4°C. Se recogió la fracción mitocondrial, correspondiente a la fracción entre el 23% y el 40% de Percoll, se lavó dos veces con 1 ml de buffer A a 10.300 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet mitocondrial final se resuspendió en 90 µl de medio MAS 1x (70 mM sacarosa, 220 mM manitol, 10 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 2 mM HEPES, 1 mM EGTA y 0.2% (p/v) albúmina libre de ácidos grasos, pH 7.2). Los riñones se homogenizaron (1:10, p/v) en el buffer de respiración A (250 mM sacarosa, 0.5 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris and 1% albúmina libre de ácidos grasos) a 800 rpm en un homogeneizador de cristal-teflón. El homogenado se centrifugó a 500 g durante 7 minutos a 4°C, y el sobrenadante resultante se centrifugó nuevamente a 7.800 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer de respiración B (250 mM sacarosa, 0.5 mM Na₂EDTA y 10 mM Tris), y se reservó una alícuota para la determinación de proteínas. El resto de muestra se centrifugó a 6.000 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer A y se centrifugó nuevamente a

6.000 g durante 10 min a 4°C. El pellet mitocondrial final se resuspendió en medio MAS 1x.

La respiración mitocondrial se midió utilizando el dispositivo *XFe 24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience) (Rogers et al., 2011). En primer lugar, se diluyeron las mitocondrias en medio MAS 1x frío en el volumen necesario para obtener la concentración requerida por placa (2,5 µg/pocillo para riñón y 3 µg/pocillo para cerebro) y se distribuyeron 50 µl de la suspensión mitocondrial en cada pocillo (excepto en los pocillos utilizados como blancos para la corrección del ruido de fondo), manteniendo la placa en hielo. A continuación, la placa se centrifugó a 2.000 g durante 10 min a 4°C. Tras la centrifugación se añadió a cada pocillo 450 µl de medio MAS 1x con sustratos (10 mM succinato, 2 mM malato, 2 mM glutamato y 10 mM piruvato). La respiración mitocondrial se midió de forma secuencial en un estado acoplado con los sustratos presentes (respiración basal o Estado 2), seguido del Estado 3o (respiración fosforilativa en presencia de ADP y sustratos). El Estado 4 (respiración residual) se midió tras la adición de oligomicina cuando todo el ADP se había consumido y la máxima capacidad respiratoria (Estado 3u) se midió tras la adición de FCCP. Las inyecciones se sucedieron de la siguiente forma: inyección A, 50 µl de 40 mM de ADP (4 mM final); inyección B, 55 µl de 30 µg/ml oligomicina (3 µg/ml final); inyección C, 60 µl de 40 µM de FCCP (4 µM final); e inyección D, 65 µl de

Eliana Barriocanal Casado

40 μM de antimicina A (4 μM final). Todos los datos se expresaron en pmol/min/ μg proteína.

3.9 MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN CÉLULAS

La medida del consumo de oxígeno (OCR) se realizó en fibroblastos adherentes con el dispositivo XFe 24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). Cada línea celular se sembró en 6 pocillos de la placa de siembra de 24 pocillos XF (Seahorse Bioscience) a una densidad de 5×10^4 células por pocillo en 250 μl de DMEM y se dejaron a 37°C y 5% de CO_2 durante 16 horas. A continuación se cambió el medio por 525 μl del medio de respiración (XF Base Medium Minimal DMEM, (Seahorse Bioscience, #102353-100), 1 mM piruvato, 1 mM L-glutamina, 1,8 g/l glucosa, pH 7,4) precalentado a 37°C , y se dejaron una hora en reposo en un incubador sin CO_2 antes de empezar el procedimiento.

Tras las medidas de respiración basal, se midió el OCR tras la adición secuencial de los inyectables a cada pocillo: 75 μl de oligomicina, 75 μl de FCCP y 75 μl de rotenona+antimicina A, para alcanzar concentraciones de 1 μM , 0,75 μM , y 1 μM , respectivamente.

La capacidad respiratoria de reserva (“*spare respiratory capacity*”) se calculó de acuerdo al Manual para Usuarios del kit del test de estrés

mitocondrial XF (SeaHorse Biosciences): Capacidad respiratoria de reserva = (Respiración máxima) - (Basal Respiración). La medida de respiración no mitocondrial se restó tanto en la respiración máxima como en la respiración basal. La capacidad respiratoria de reserva proporciona una idea de la capacidad de producción máxima de ATP de las células; por lo que las células con una mayor capacidad tienen una mayor capacidad para responder al estrés.

3.10 HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

El cerebro de los ratones se extrajo rápida y cuidadosamente y se fijaron en formalina hasta un máximo de 24 horas. Se llevó a cabo una deshidratación a través de soluciones con distintos porcentajes de etanol y se embebieron en parafina. Se cortaron secciones de 4 μm con el microtomo y procedió a la desparafinización con xileno y la tinción con hematoxilina eosina (H&E). La inmunohistoquímica se llevó a cabo en otros cortes de la misma región del cerebro, usando los siguientes anticuerpos primarios: el marcador de astrocitos anti-GFAP (*“glial fibrillary acidic protein”*, (Millipore, MAB360)) y el marcador de microglía anti-Iba-1 (Wako, 019-19741). Para la identificación de los antígenos por microscopía se utilizó el kit Dako Animal Research para los anticuerpos primarios (Dako Diagnóstico S.A., España). Las diferentes secciones se examinaron con un microscopio OLYMPUS CX41 a 40-400x. Las imágenes fueron procesadas bajo las

Eliana Barriocanal Casado

mismas condiciones de luz con el software CELL A (García-Corzo et al., 2013). La señal de GFAP se cuantificó usando el software ImageJ (National Institutes of Health, USA) y los resultados se expresaron en porcentaje de señal positiva respecto al área total.

3.11 IMAGEN Y ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA (MRI Y MRS) IN VIVO

Los análisis de MRI y MRS se llevaron a cabo en un imán 7 T horizontal Bruker Biospec TM 70/20 USR diseñado para animales de experimentación en el Centro de Investigación Biomédica de la UGR. Después de la exploración localizada, se adquirieron datos de alta resolución axial y coronal en T2 para visualizar cualquier atrofia cerebral o estructural e investigar posibles patologías focalizadas (Diaz, Garcia, Padgett, & Moraes, 2012).

3.12 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO RNA-Seq

Para el RNA-Seq se tomó la región central del cerebro de los ratones y se extrajo el RNA siguiendo el protocolo TRI Reagent Solution de Applied Biosystems. Se analizó la calidad e integridad del RNA y se seleccionaron las muestras con un RIN (*RNA integrity number*) por encima de 8. La preparación de las librerías y la secuenciación se llevó a cabo en el laboratorio de análisis genómico y transcriptómico de la unidad central NGS del centro médico de la Universidad de Göttingen. Las librerías se prepararon

a partir de 500 ng de RNA total de cadena lineal usando un método de secuenciación paralelo masivo de mRNA de Illumina (TruSeq RNA Library Preparation Kit V2; Set A; 48 samples, 12 indexes, Cat. NRS-122-2001). Para la cuantificación precisa de las bibliotecas de cDNA se usó un sistema basado en fluorometría, el sistema de dsDNA QuantiFluor™ de Promega. El tamaño de las librerías de cDNA final se determinó utilizando el kit dsDNA 905 Reagent Kit (Fragment Analyzer de Advanced Bioanalytical), que mostró un tamaño promedio de 300 pb. Las librerías se agruparon y secuenciaron con Illumina HiSeq 4000 (SE; 1×50 pb; 30–35 Mio reads/sample).

Las imágenes de las secuencias se transformaron con el software BaseCaller de Illumina en archivos BCL, que se separaron en archivos fastq con “bcl2fastq v2.17.1.14”. El control de calidad se realizó con FastQC (versión 0.11.5, Babraham Bioinformatics). Las lecturas secuenciadas (Illumina 50bp single-end) se mapearon en el genoma de referencia utilizando TopHat2 (versión 2.1.0) y la cuantificación de los transcritos se realizó con Cufflinks (versión 2.2.1), utilizando Partek Flow (Partek, St. Louis, MO, USA). Los datos fueron normalizados con el método RMA (Robust Multiarray Average). La lista de genes expresados diferencialmente (DEG) se obtuvo usando un análisis estadístico ANOVA corregido con FDR (False Discovery Rate) con un límite de P-value ajustado <0,05. La

Eliana Barriocanal Casado

sobreexpresión o subexpresión se representó como \log_2FC (logaritmo en base 2 del *Fold Change*). El análisis de las rutas se llevó a cabo con el software IPA (Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN)).

3.13 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS Y ANÁLISIS LC-HRMS

Las muestras congeladas a -80°C se liofilizaron (Virtis-Benchtop K, Fisher Scientific, España). El método de extracción/homogenización de metabolitos fue adaptado del método descrito por Römisch-Margl y colaboradores (Römisch-Margl et al., 2012). Los metabolitos se extrajeron del hígado y del cerebro añadiendo 300 μl de una mezcla de metanol/agua (8:2, v/v) fría a ~50 mg de muestra liofilizada y se homogenizaron/extrajeron en tubos de microcentrifugación de 1,5 ml con perlas de acero inoxidable de 1,4 mm usando un homogeneizador de bolas (Bullet blender blue, Next Advance, EE. UU.) equipado con una unidad de refrigeración integrada. Los tejidos se homogenizaron tres veces durante 30 segundos a 6.000 rpm. Posteriormente, los tubos se sonicaron en el baño durante 1 minuto, se incubaron a 4°C durante 60 minutos y se centrifugaron a 5000 g y 4°C durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron analizados por LC- (ESI) qTOF.

Los análisis LC-HRMS (“*Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry*”) se realizaron de acuerdo con el método METLIN/PCDL de Agilent utilizando un UHPLC 1290 infinity acoplado a un 6550 ESI-QTOF

(Agilent Technologies) que opera en modo de ionización por electrospray positivo y negativo. Los metabolitos se separaron en la columna Zorbax SB-Aq RR (50 x 2.1 mm, 1,8 µm) usando una elución de gradiente continuo.

Los datos de LC-HRMS se descriptaron utilizando el algoritmo Find by Molecular Feature del software de análisis cualitativo Mass Hunter (Agilent Technologies) y las características detectadas se alinearon en las muestras utilizando el software Mass Profiler Professional (MPP) (Agilent Technologies). La cuantificación relativa de los metabolitos se basó en el área del pico de cada característica normalizada por el peso de la muestra. La identificación de metabolitos se realizó mediante el uso de la base de datos METLIN/PCDL utilizando la extensión de navegador ID del software MPP, que combina el tiempo de retención con la coincidencia de masa precisa para proporcionar una mayor confianza en la identificación del compuesto.

3.14 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE RAPAMICINA EN SANGRE

Las muestras de sangre se recogieron en tubos de EDTA durante el ciclo de luz mediante punción en la vena facial de los animales a los 3 meses de edad. Se mezclaron 50 µl de cada muestra con 75 µl de 0,1 M ZnSO₄ y 125 µl de metanol durante 30 min. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min y se recogieron los sobrenadantes y se inyectaron en el Sistema de cromatografía

Eliana Barriocanal Casado

líquida H-Class (WatersCorporation) acoplado a un espectrómetro de masas Xevo TQS (MS/MS) con ionización por electrospray (Waters Corporation). La columna de separación fue BEH C4, 1.7 μm , 2.1 \times 50 mm column (Waters, Spain); y la fase móvil consistió en (A) 10 mM formato amónico y (B) metanol. Se utilizó un sistema binario de gradiente a un flujo de 0,400 ml/min. Los 4 primeros minutos, el ratio de A y B se mantuvo a 50:50 (v/v) y del minuto 4 al 8,5 el ratio se cambió a 0:100 (v/v), antes de volver a las condiciones iniciales [A:B, 50:50 (v/v)] hasta 8,6 min (Upadhyay, Trivedi, Shah, Yadav, & Shrivastav, 2014). Las temperaturas de fuente y desolvatación se fijaron a 140 y 500°C, respectivamente. El nitrógeno se usó como gas cónico (150 l/h) y gas de desolvatación (800 l/h), y el argón se usó como gas de colisión (0,14 ml/min). Para la detección y cuantificación de la rapamicina, se seleccionó el ión amonio, que da un pico a una masa de 931.6509, y los aductos de ión amonio correspondientes a una masa de 864.4501 y 83.4604. La curva estándar de rapamicina se realizó a 25, 50, 100 y 200 ng/ml. Los resultados se expresaron en ng rapamicina/ml de sangre.

3.15 CITOMETRÍA DE FLUJO

Se recogieron las mHSCs en cultivo o la sangre y las células disgregadas mecánicamente de los tejidos de los ratones previamente perfundidos, se lavaron con PBS + 2% FBS frío y se llevó a cabo una tinción de superficie simple o doble con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con

fluorocromo: anti-mouse Ly-6A/E (Sca1)-PE (eBioscience), anti-mouse CD11b-APC (BD-Bioscience), anti-mouse CD33-PE (BD-Bioscience), anti-mouse CD3-APC (BD-Bioscience) y anti-mouse B220-V450, a una dilución 1:50, durante 15 minutos a temperatura ambiente o 30 minutos a 4°C en oscuridad. Se lavaron las células para eliminar el exceso de anticuerpo y se analizaron usando el citómetro de flujo FACS CantoII (BectonDickinson) y el software FACS Diva (BD Biosciences). Para el análisis de eGFP, las células en cultivo o la sangre o células disgregadas de los tejidos del ratón se lavaron con PBS + 2% FBS frío y se pasaron directamente por el citómetro.

3.16 ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN Y CRECIMIENTO EN TIEMPO

REAL

La adhesión y proliferación de los fibroblastos embrionarios $Coq9^{+/+}$, $Coq9^{R239X}$ y $Coq9^{R239X}$ transducidos se midió utilizando el sistema de análisis en tiempo real xCelligence de Roche (Roche Applied Science, Penzberg, Germany, www.roche.com). Se agregaron 1.000 células/pocillo a placas de 16 pocillos (*E-plates*), y las placas cargadas con los diferentes grupos experimentales de células se colocaron en el xCelligence situado dentro del incubador en condiciones de normoxia (5% de CO₂ a 37 ° C) para el registro continuo de la impedancia (una medida directa de la cantidad de células adheridas a la placa en cada punto de tiempo reflejada como el índice celular (Carrillo-Galvez et al., 2015)).

3.17 ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES SANGUÍNEOS MEDIANTE HEMOGRAMA

La sangre se recolectó en tubos con EDTA mediante punción en la vena submandibular con ayuda de una lanceta. Los hemogramas se obtuvieron usando un analizador hematológico automatizado (Mythic 22 CT).

3.18 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software científico Graphpad. Los datos se expresaron como la media \pm DE (desviación estándar) con una $n = 5-10$ por cada grupo experimental, excepto para la curva de supervivencia y el test de rotarod, donde se utilizó un mayor número de animales, y en los ensayos piloto de terapia génica *in vivo* y *ex vivo*, donde se utilizaron grupos con un tamaño de muestra más reducido. Para comparar la media entre dos grupos diferentes se realizó un análisis de la t de Student, mientras que para comparar la media de tres grupos diferentes se utilizó una ANOVA de una vía con un test post hoc de Tukey, considerando un valor de P menor de 0,05 como estadísticamente significativo. La estadística de la supervivencia se analizó mediante los tests log-rank (Mantel-Cox) y Gehan-Breslow-Wilcoxon. El efecto del tamaño de muestra fue calculado usando la aplicación disponible online <http://www.biomath.info/power/ttest.htm>. El número de animales en cada grupo fue tomado para poder detectar cambios

de aproximadamente un 60% de las medidas de los biomarcadores (asumiendo una significancia alfa = 0,05 y un poder beta = 0,8). La distribución Gaussiana se comprobó mediante el software de Graphpad: <http://graphpad.com/quickcalcs/probability1.cfm>.

Eliana Barriocanal Casado

RESULTADOS

Parte de los resultados mostrados en este apartado están recogidos en los siguientes trabajos publicados:

1. “*Rapamycin administration is not a valid therapeutic strategy for every case of mitochondrial disease*”. EBioMedicine, 2019. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.03.025

Barriocanal-Casado E, Hidalgo-Gutiérrez A, Raimundo N, González-García P, Acuña-Castroviejo D, Escames G, López LC

2. “*Gene Therapy Corrects Mitochondrial Dysfunction in Hematopoietic Progenitor Cells and Fibroblasts from $Coq9^{R239X}$ Mice*”. PLoS One, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0158344.

Barriocanal-Casado E, Cueto-Ureña C, Benabdellah K, Gutierrez-Guerrero A, Cobo M, Hidalgo-Gutiérrez A, Rodríguez-Sevilla JJ, Martín F, and Lopez LC

4. RESULTADOS

4.1 TERAPIA FARMACOLÓGICA: INHIBICIÓN DE mTOR

4.1.1 LA RAPAMICINA NO MEJORA LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS RATONES *Coq9^{R239X}*

En primer lugar, para comprobar si la rapamicina podría tener un efecto terapéutico general válido para las encefalomiopatías mitocondriales, tratamos nuestros ratones *Coq9^{R239X}* con dos dosis diferentes de rapamicina activa encapsulada en el pienso: 28 ppm (dosis baja), que se ha utilizado en estudios de envejecimiento (Harrison et al., 2009); y 225 ppm (dosis alta), que es similar a la dosis utilizada en el modelo de ratón *Ndufs4^{-/-}* (S. C. Johnson et al., 2015). Los tratamientos se iniciaron a un mes de edad, antes de la aparición de los síntomas graves de la enfermedad. Los ratones *Coq9^{R239X}* mostraban un tamaño y peso corporal reducidos, en comparación con los ratones *Coq9^{+/+}*, tanto en machos (Fig. 11a) como en hembras (Fig. 11b). Estas diferencias ya estaban presentes en el primer mes de edad, haciéndose más evidentes con el tiempo. La dosis baja de rapamicina no indujo cambios en el peso corporal de los ratones *Coq9^{R239X}* en ninguno de los dos sexos en comparación con los ratones *Coq9^{R239X}* no tratados, mientras que con la dosis alta los ratones experimentaron una disminución muy acusada en el peso corporal (Fig. 11, a, b y d). Además, se evaluó la

Eliana Barriocanal Casado

coordinación motora a través del test de rotarod con aceleración, y los ratones *Coq9^{R239X}* mostraron una menor capacidad de coordinación, ya que aguantaban menos tiempo en la barra rotatoria y la mayoría caían antes de los 100 segundos. Ninguna de las dosis de rapamicina probadas consiguió aumentar el tiempo de latencia de los ratones *Coq9^{R239X}* en el ensayo de rotarod (Fig. 11c). En el mismo sentido, al analizar la supervivencia con los tratamientos de rapamicina a ambas dosis, comprobamos que la terapia con rapamicina no conseguía aumentar la supervivencia de los ratones *Coq9^{R239X}*. No solo no conseguía mejorar la supervivencia, sino que, además, la dosis alta de rapamicina tenía un efecto negativo significativo sobre la supervivencia, de modo que la mayoría de los animales murieron entre los 3 y 4 meses de edad y todos los ratones con este tratamiento de dosis alta estaban muertos antes de los 6 meses de edad (Fig. 11e).

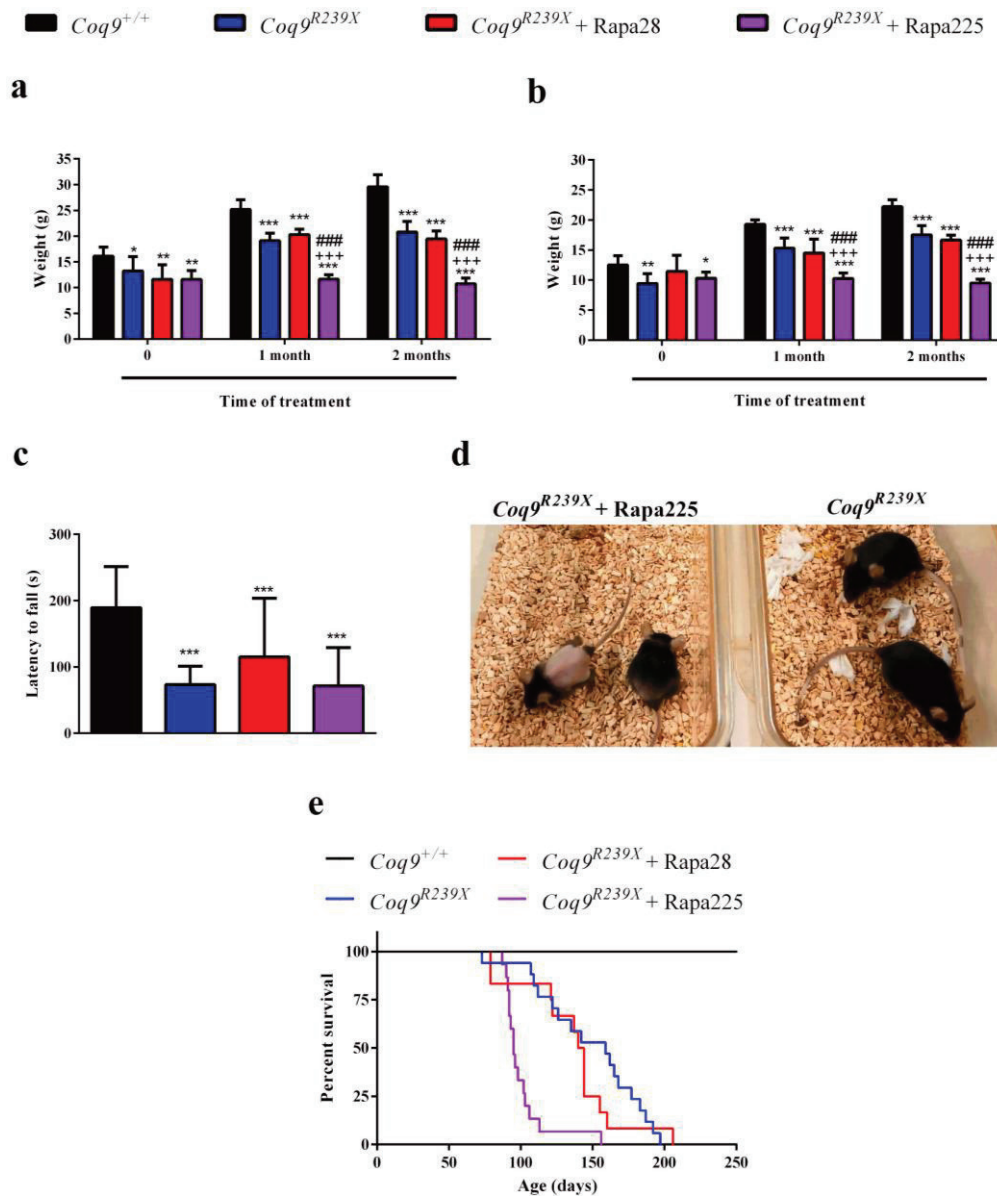


Figura 11. Caracterización fenotípica y supervivencia de ratones *Coq9*^{R239X} tras los tratamientos con rapamicina.

(a, b) Peso corporal de machos (a) y hembras (b) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{R239X}, y *Coq9*^{R239X} tras los tratamientos de 28 o 225 ppm de rapamicina. [(a): *Coq9*^{+/+}, *n* = 10; *Coq9*^{R239X}, *n* = 10; *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 ppm *n* = 4; *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 225 ppm, *n* = 10. (b): *Coq9*^{+/+}, *n* = 10; *Coq9*^{R239X}, *n* = 10; *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 ppm, *n* = 5; *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 225 ppm, *n* = 10]. (c) Test de rotarod en ratones *Coq9*^{+/+} (*n* = 49), *Coq9*^{R239X} (*n* = 37) y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28

($n=12$) y 225 ($n=22$) ppm. (d) Imágenes comparativas de ratones $Coq9^{R239X}$ y $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 225 ppm a 3 meses de edad. (e) Curva de supervivencia de ratones $Coq9^{+/+}$, $Coq9^{R239X}$, y $Coq9^{R239X}$ tratados con 28 o 225 ppm de rapamicina. Los tratamientos empezaron a un mes de edad. $Coq9^{+/+}$, $n=10$, $Coq9^{R239X}$, $n=17$, $Coq9^{R239X}$ - 28 ppm, $n=12$, y $Coq9^{R239X}$ - 225 ppm, $n=15$. Los análisis a través de los tests log-rank (Mantel-Cox) y Gehan-Breslow-Wilcoxon mostraron diferencias significativas entre $Coq9^{+/+}$ y $Coq9^{R239X}$ ($P<0,0001$ y $P<0,0001$, respectivamente); $Coq9^{+/+}$ y $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 28 ppm ($P<0,0001$ y $P<0,0001$, respectivamente); $Coq9^{+/+}$ y $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 225 ppm ($P<0,0001$ y $P<0,0001$, respectivamente); $Coq9^{R239X}$ y $Coq9^{R239X}$ -225 ppm ($P<0,0001$ y $P<0,0001$, respectivamente); y $Coq9^{R239X}$ - 28 ppm y $Coq9^{R239X}$ -225 ppm ($P=0,0032$ y $P=0,0090$, respectivamente).

Los datos están expresados como la media aritmética \pm SD. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; $Coq9^{+/+}$ versus $Coq9^{R239X}$ o $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. +++ $P<0,001$; $Coq9^{R239X}$ versus $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. #### $P<0,001$; $Coq9^{R239X}$ -28 ppm versus $Coq9^{R239X}$ -225 ppm (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey o t-test).

4.1.2 LAS LESIONES CEREBRALES PERMANECEN TRAS EL TRATAMIENTO CON RAPAMICINA EN LOS RATONES $Coq9^{R239X}$

La ausencia de mejora fenotípica tras los tratamientos con rapamicina debía reflejarse también a nivel histopatológico, ya que previamente nuestro grupo había descrito que los ratones $Coq9^{R239X}$ muestran espongiosis severa y astrogliosis reactiva en diferentes áreas del cerebro, como el puente, el bulbo raquídeo y el diencéfalo. Así, observamos una profunda vacuolización y proliferación de astrocitos (como indica el marcador de astrocitos GFAP) en el diencéfalo y el puente de los ratones $Coq9^{R239X}$ (Fig. 12, b1-b4; Fig. 13, b1, e; Fig. 14, b1-b4), en comparación con los ratones $Coq9^{+/+}$ (Fig. 12, a1-a4; Fig. 13, a1, e; Fig. 14, a1-a4). Estas características histopatológicas también fueron evidentes en los ratones $Coq9^{R239X}$ tratados, aunque la astrogliosis se redujo parcialmente, especialmente en el diencéfalo (Fig. 12, c1-c4, d1-d4;

Fig. 13, c1, d1, e ; Fig. 14, c1-c4, d1-d4). Dado que la rapamicina tiene potentes propiedades inmunosupresoras y en los ratones *Ndufs4^{-/-}* indujo una reducción de la microgliosis (S. C. Johnson et al., 2013), analizamos también un marcador para detectar microglía en los cortes cerebrales, Iba-1. Sin embargo, no se observó microgliosis en el diencéfalo ni en el puente de los ratones *Coq9^{R239X}* de forma general y solo se detectaron algunas pequeñas regiones de proliferación de microglía en algunas preparaciones, muy localizadas y poco frecuentes (Fig. 12, b5-b6; Fig. 14, b5-b6). De la misma manera, los ratones mutantes tratados con rapamicina, tanto a dosis baja (Fig. 12, c5-c6; Fig. 13c2; Fig. 14, c5-c6), como a dosis alta (Fig. 12, d5-d6; Fig. 13d2; Fig. 14, d5-d6), mostraron una señal para microglía comparable a la de los ratones *Coq9^{+/+}* (Fig. 12, a5-a6; Fig. 13, a2, a5-a6) y *Coq9^{R239X}* (Fig. 12, b5-b6; Fig. 13b2; Fig. 14, b5-b6).

Además, las manifestaciones patológicas en el cerebro de los ratones *Coq9^{R239X}* se confirmaron aún más mediante imágenes de resonancia magnética, en las cuales los ratones *Coq9^{R239X}* mostraron importantes lesiones (Fig. 12, f1-f2) que persistían en el cerebro de los ratones tratados con rapamicina a ambas dosis (Fig. 12, g1-h2).

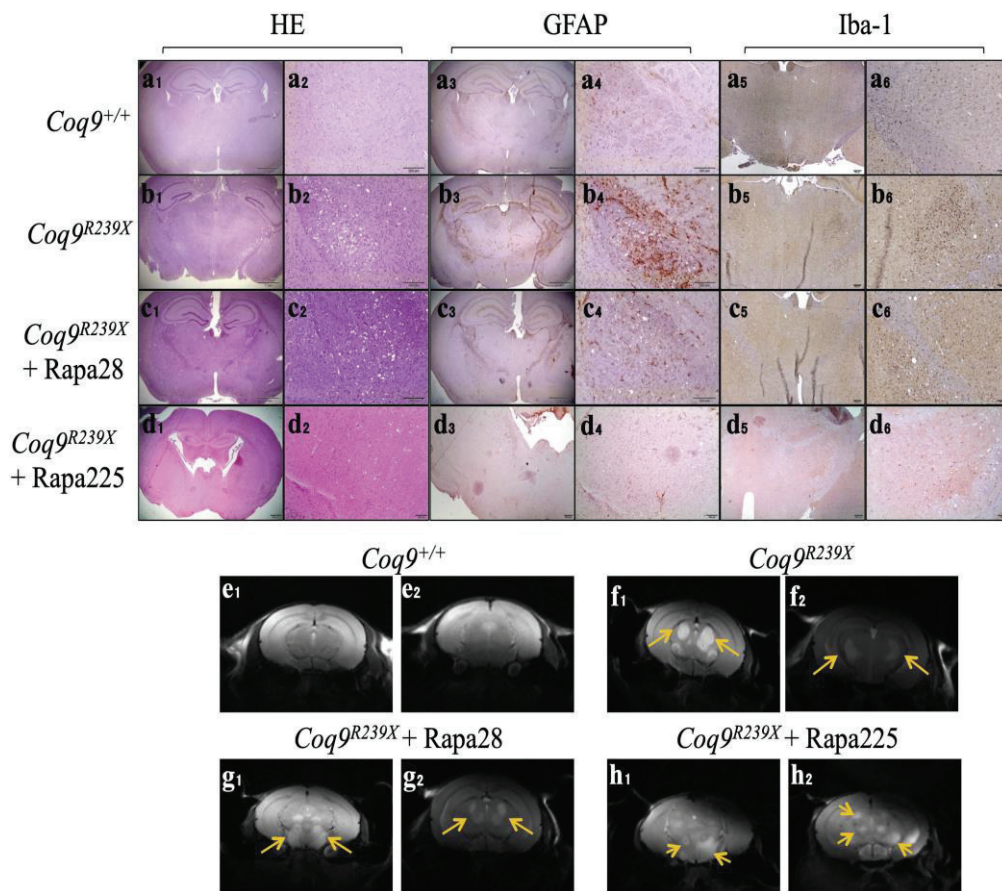


Figura 12. Manifestaciones patológicas en distintas secciones de cerebro de ratones *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm.

(a₁-a₂ a d₁-d₂) Tinción hematoxilina-eosina en el diencéfalo de ratones *Coq9*^{+/+} (a₁ y a₂), *Coq9*^{R239X} (b₁ y b₂), *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 ppm (c₁ y c₂), y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 225 ppm (d₁ y d₂). (a₃-a₄ a d₃-d₄) Tinción anti-GFAP en el diencéfalo de ratones *Coq9*^{+/+} (a₃ y a₄), *Coq9*^{R239X} (b₃ y b₄), *Coq9*^{R239X} -28 ppm (c₃ y c₄), y *Coq9*^{R239X} - 225 ppm (d₃ y d₄). (a₅-a₆ a d₅-d₆) Tinción anti-Iba-1 en el diencéfalo de ratones *Coq9*^{+/+} (a₅ y a₆), *Coq9*^{R239X} (b₅ y b₆), *Coq9*^{R239X} -28 ppm (c₅ y c₆), y *Coq9*^{R239X} - 225 ppm (d₅ y d₆). (e₁-e₂ a h₁-h₂) Imágenes de resonancia magnética del diencéfalo de ratones *Coq9*^{+/+} (e₁ y e₂), *Coq9*^{R239X} (f₁ y f₂), y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 (g₁ y g₂) o 225 ppm (h₁ y h₂). Barras de escala: 500 μm (a₁-d₁); 200 μm (a₂-d₂); 500 μm (a₃-d₃); 200 μm (a₄-d₄); 500 μm (a₅-d₅); 200 μm (a₆-d₆). Las flechas amarillas indican las áreas donde hay un incremento de señal T2, lo cual es característico de lesiones en regiones específicas del cerebro.

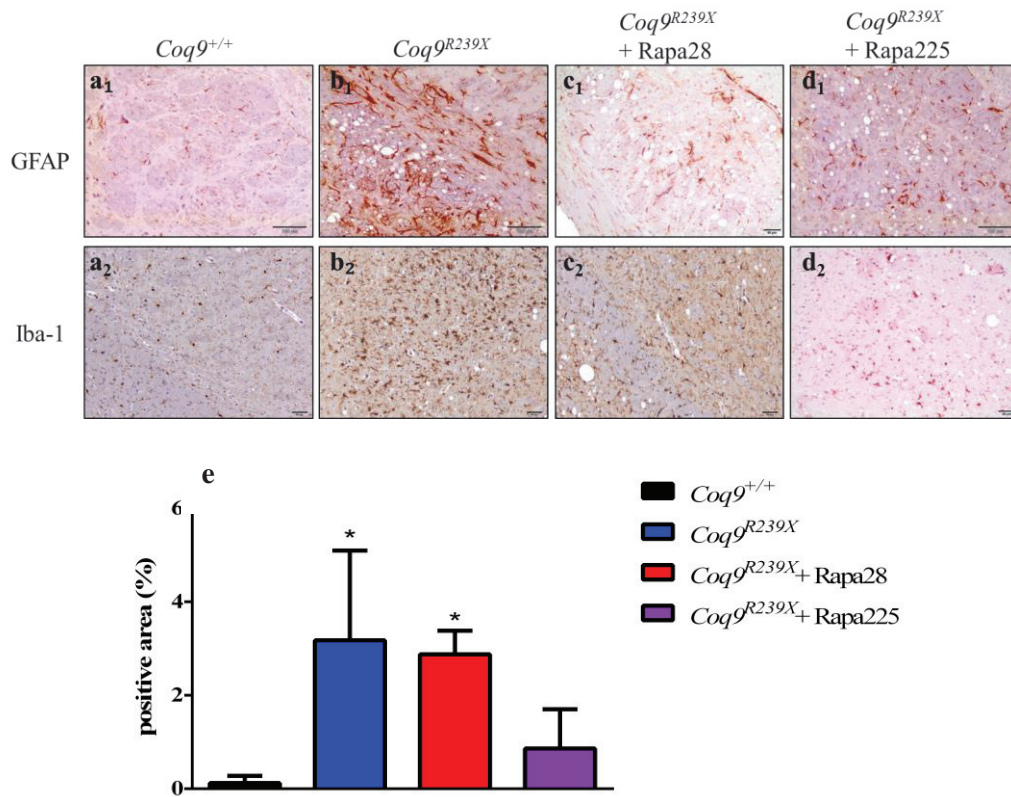


Figura 13. Imágenes a más aumentos de los marcadores GFAP e Iba-1 en diencéfalo y cuantificación de GFAP en diencéfalo. Tinción anti-GFAP en el diencéfalo de ratones *Coq9*^{+/+} (a₁), *Coq9*^{R239X} (b₁), y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 ppm (c₁), y 225 ppm (d₁). Tinción anti-Iba-1 en el puente de ratones *Coq9*^{+/+} (a₂), *Coq9*^{R239X} (b₂), *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 ppm (c₂), y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 225 ppm (d₂). (e) Cuantificación de la astrogliosis en diencéfalo expresada como la media aritmética ± SD, determinada por el software ImageJ. **P* < 0.05; *Coq9*^{+/+} versus *Coq9*^{R239X} o *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

Por tanto, el tratamiento con rapamicina no era capaz de corregir las principales manifestaciones patológicas en el cerebro de los ratones *Coq9*^{R239X} y, en consecuencia, no se vieron mejoras en el fenotipo y no aumentó la supervivencia en este modelo de ratón.

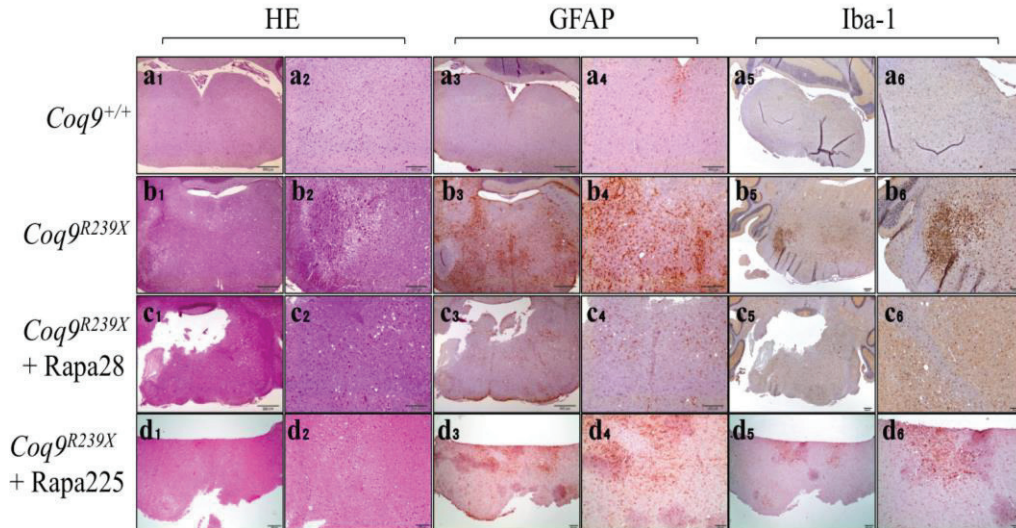


Figura 14. Caracterización histopatológica del puente de los ratones $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. (a₁-a₂ a d₁-d₂) Tinción hematoxilina-eosina en el puente de ratones $Coq9^{+/+}$ (a₁ y a₂), $Coq9^{R239X}$ (b₁ y b₂), $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 28 ppm (c₁ y c₂), y $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 225 ppm (d₁ y d₂). (a₃-a₄ a d₃-d₄) Tinción anti-GFAP en el puente de ratones $Coq9^{+/+}$ (a₃ y a₄), $Coq9^{R239X}$ (b₃ y b₄), $Coq9^{R239X}$ - 28 ppm (c₃ y c₄), y $Coq9^{R239X}$ - 225 ppm (d₃ y d₄). (a₅-a₆ a d₅-d₆) Tinción anti-Iba-1 en el puente de ratones $Coq9^{+/+}$ (a₅ y a₆), $Coq9^{R239X}$ (b₅ y b₆), $Coq9^{R239X}$ - 28 ppm (c₅ y c₆), y $Coq9^{R239X}$ - 225 ppm (d₅ y d₆). Barras de escala: 500 μ m (a₁-d₁); 200 μ m (a₂-d₂); 500 μ m (a₃-d₃); 200 μ m (a₄-d₄); 500 μ m (a₅-d₅); 200 μ m (a₆-d₆).

4.1.3 LA RAPAMICINA INHIBE mTORC1 SIN INDUCIR AUTOFAGIA EN LOS RATONES $Coq9^{R239X}$

Tras los resultados previos, intentamos verificar si los niveles de rapamicina en sangre se incrementaban al administrar esta droga por vía oral (Tabla 2), y observamos que los niveles eran comparables a los publicados previamente en el modelo $Ndufs4^{-/-}$ por Johnson y colaboradores (S. C. Johnson et al., 2015). Para verificar si la administración de rapamicina en la

Resultados

comida era capaz de inhibir mTORC1 en los ratones *Coq9^{R239X}*, analizamos el estado de fosforilación de la proteína S6R (p-S6R), la cual es una de las dianas de la quinasa mTORC1, en corazón, riñón, hígado y cerebro. El ratio p-S6R/S6R fue similar en los 4 tejidos de los ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{R239X}* (Fig. 15, a–d), aunque observamos una gran variabilidad en los tejidos de los ratones *Coq9^{R239X}*. A 28 ppm, la rapamicina no produjo cambios significativos en el ratio p-S6R/S6R en ninguno de los cuatro tejidos (Fig. 15, a–d). Sin embargo, la dosis alta de rapamicina afectó a todos los tejidos examinados produciendo una clara inhibición de mTORC1, tal como se reflejó en la reducción del ratio p-S6R/S6R, en comparación con los ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{R239X}* no tratados (Fig. 15, a–d).

Genotype	Administration Route	Number of samples with detected levels of rapamycin	Type of Sample	Levels of rapamycin (ng/ml)
<i>Coq9^{+/+}</i>	not treated	0/5	Blood	UND
<i>Coq9^{R239X}</i>	not treated	0/5	Blood	UND
<i>Coq9^{R239X}</i>	Oral 225 ppm	9/9	Blood	605,33 ± 436,18

Tabla 2. Niveles de rapamicina en sangre. La recolección de muestras se realizó tras dos meses de tratamiento, cuando los animales tenían 3 meses de edad.

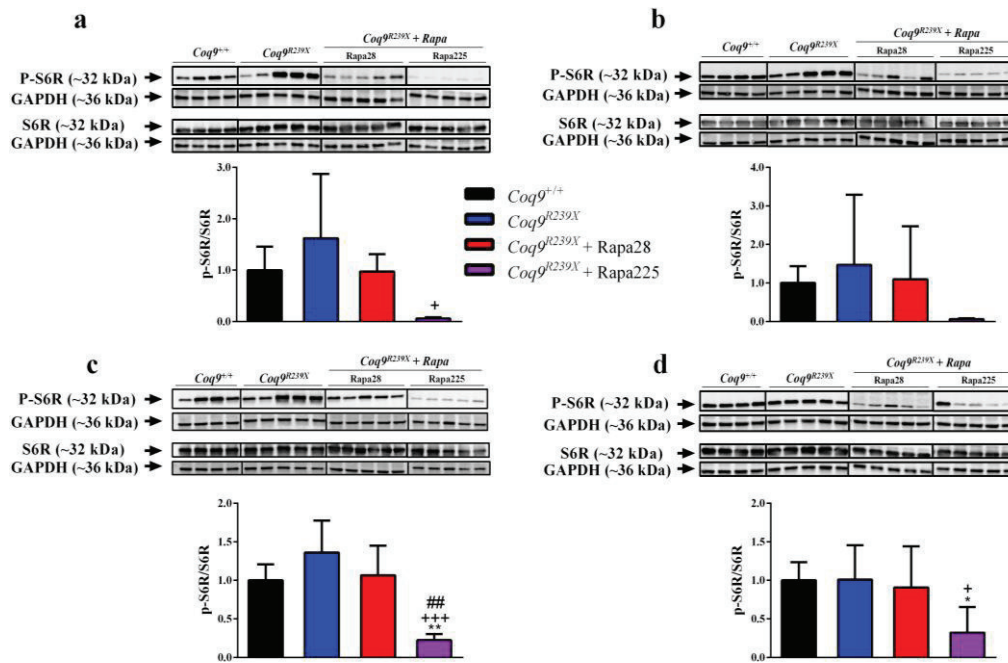


Figura 15. Inhibición de mTORC1 en distintos tejidos de ratones *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. Western blots representativos del estado de fosforilación de la proteína diana de mTORC1, S6R, en corazón (a), riñón (b), hígado (c), y cerebro (d). *Coq9^{+/+}*, $n = 4-8$; *Coq9^{R239X}*, $n = 5-10$; *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 28 ppm, $n = 5$; y *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 225 ppm, $n = 5$. Los datos están expresados como la media aritmética \pm SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *Coq9^{+/+}* versus *Coq9^{R239X}* o *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. + $P < 0,05$; +++ $P < 0,001$; *Coq9^{R239X}* versus *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. ## $P < 0,01$; *Coq9^{R239X}* - 28 ppm versus *Coq9^{R239X}* - 225 ppm (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

Una de las rutas *downstream* de mTORC1 es la autofagia. En particular, varios estudios han demostrado que la inhibición de mTORC1 induce mecanismos que promueven la autofagia en células de mamíferos (Laplante & Sabatini, 2012). Por eso, analizamos dos marcadores de autofagia distintos: el ratio LC3II/LC3I y los niveles de p62, en nuestras condiciones experimentales.

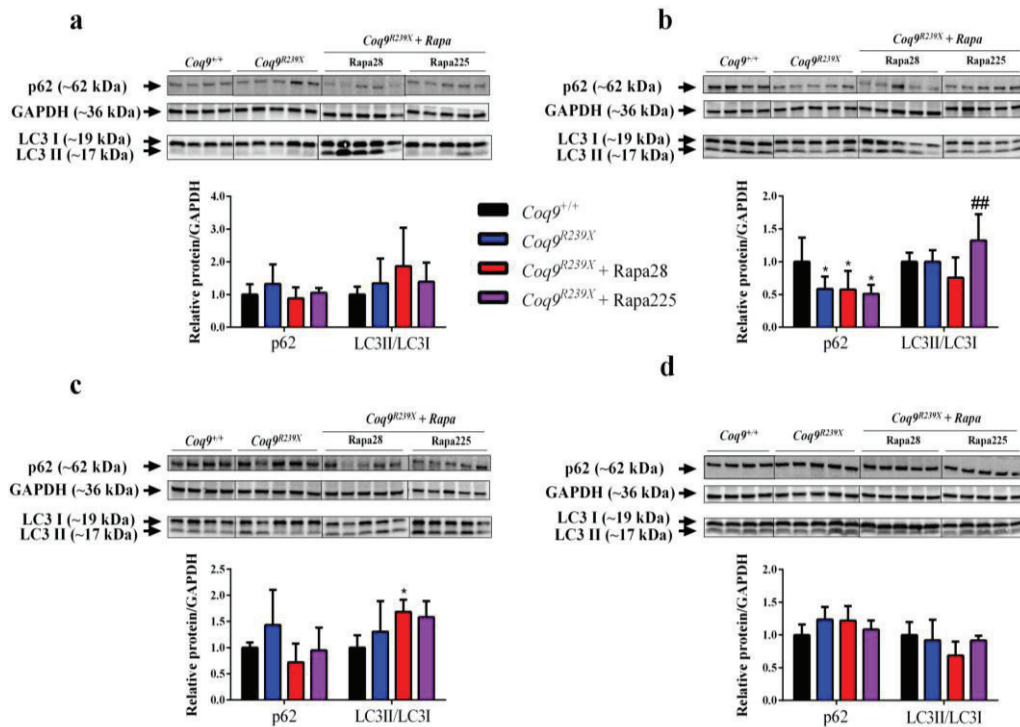


Figura 16. Alteraciones en la autofagia en distintos tejidos de ratones *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. Western blots representativos de los marcadores de autofagia p62 y LC3 en corazón (a), riñón (b), hígado (c), y cerebro (d). *Coq9^{+/+}*, $n = 4-8$; *Coq9^{R239X}*, $n = 5-10$; *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 28 ppm, $n = 5$; y *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 225 ppm, $n = 5$. Los datos están expresados como la media aritmética \pm SD. * $P < 0,05$; *Coq9^{+/+}* versus *Coq9^{R239X}* o *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. ## $P < 0,01$; *Coq9^{R239X}* - 28 ppm versus *Coq9^{R239X}* - 225 ppm (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

En el corazón y el cerebro, no detectamos diferencias en estos marcadores de autofagia entre los cuatro grupos experimentales (Fig. 16, a y d). En los riñones, los niveles de p62 estaban disminuidos en los tres grupos de ratones *Coq9^{R239X}*, tanto tratados como no tratados, mientras que el ratio LC3II/I solo aumentó en los ratones *Coq9^{R239X}* tratados con la dosis alta de rapamicina (Fig. 16b), sugiriendo que podría estar induciéndose un proceso de autofagia en estas condiciones. En el hígado, únicamente pudimos detectar

un incremento en el ratio LC3II/I en los ratones $Coq9^{R239X}$ tratados con la dosis alta de rapamicina en comparación con los ratones *wild-type* $Coq9^{+/+}$ (Fig. 16c).

Por tanto, en contra de lo que se esperaba, no hubo evidencias de una inducción general de la autofagia en los ratones $Coq9^{R239X}$ tras 2 meses de tratamiento con rapamicina. Esto podría estar relacionado con una inducción temprana de respuesta de autofagia asociada a la deficiencia en CoQ, tal como se ha reportado previamente *in vitro* (Rodríguez-Hernández et al., 2009) y como sugieren nuestros análisis en cerebro de ratones $Coq9^{R239X}$ a los dos meses de edad (Fig. 17).

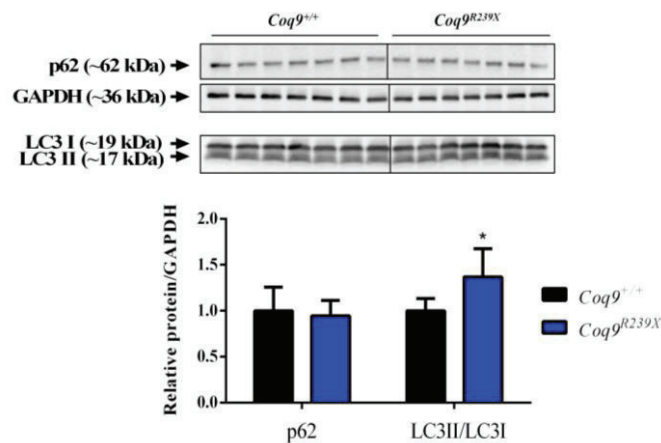


Figura 17. Imágenes representativas de western blots para los marcadores de autofagia p62 y LC3 en el cerebro de ratones $Coq9^{+/+}$ and $Coq9^{R239X}$ a 2 meses de edad. Los datos se expresaron como la media aritmética \pm SD. n=7 en cada grupo experimental. * $P < 0.05$; $Coq9^{+/+}$ versus $Coq9^{R239X}$ (*t*-test).

4.1.4 LA RAPAMICINA MODIFICA EL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO Y METABOLÓMICO DE LOS RATONES *Coq9*^{R239X}

Aunque la dosis baja de rapamicina no indujo una inhibición general de mTORC1, sus efectos sistémicos podrían estar provocando profundas alteraciones en diferentes rutas celulares en los tejidos, tal como se había descrito previamente (Siegmund et al., 2017). Considerando esta posibilidad, llevamos a cabo un análisis de transcriptómica y metabolómica en el cerebro de los ratones *Coq9*^{R239X} tratados con la dosis baja de rapamicina. Para entender mejor los cambios inducidos por la rapamicina, analizamos también el perfil transcriptómico del cerebro de los ratones *Coq9*^{R239X} tratados con la dosis alta de rapamicina; y la metabolómica en el hígado de los ratones *Coq9*^{R239X} tratados con la dosis baja, ya que este tejido es el primer órgano expuesto a la rapamicina en la administración oral con un importante papel en el metabolismo de drogas (Siegmund et al., 2017).

El análisis transcriptómico reveló 138 genes diferencialmente expresados (DEGs) entre los ratones mutantes *Coq9*^{R239X} y los *wild-type* *Coq9*^{+/+} (82 sobre-regulados y 56 sub-regulados); 2.876 DEGs entre los ratones *Coq9*^{R239X} no tratados y los ratones *Coq9*^{R239X} tratados con la dosis baja de rapamicina (166 sobre-regulados y 2.710 sub-regulados); y 3.007 DEGs entre los ratones *Coq9*^{R239X} no tratados y los ratones *Coq9*^{R239X} tratados con la

Eliana Barriocanal Casado

dosis alta de rapamicina (2.919 sobre-regulados y 88 sub-regulados) (P value ajustado < 0.05) (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-7794/>).

El análisis de los datos a través del software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) nos permitió identificar las vías y redes alteradas (Fig. 18). Entre ellas, observamos que había varias rutas relacionadas con la inflamación que estaban alteradas en el cerebro de los ratones $Coq9^{R239X}$ en comparación con los ratones $Coq9^{+/+}$, como la ruta de IL-8, la vía de MAPK, IL-2, NF- κ B o de receptores de células del sistema inmunitario (Fig. 18a). La mayoría de estas rutas permanecían alteradas tras el tratamiento con rapamicina, tanto a la dosis baja como a la dosis alta (Fig. 18, b y c). No obstante, se observó que el tratamiento con rapamicina tenía efecto sobre algunas vías relacionadas con la biología mitocondrial, como la vía de mTOR, la ruta de señalización de sirtuina, la vía AMPK, la respuesta a estrés oxidativo mediada por NRF-2, la vía PPAR α /RXR α o la disfunción mitocondrial (Fig. 18b, c y d), todas ellas consideradas, curiosamente, como dianas terapéuticas potenciales en distintas enfermedades mitocondriales (Cerutti et al., 2014; Ito et al., 2017; McCormack et al., 2015; Viscomi et al., 2011).

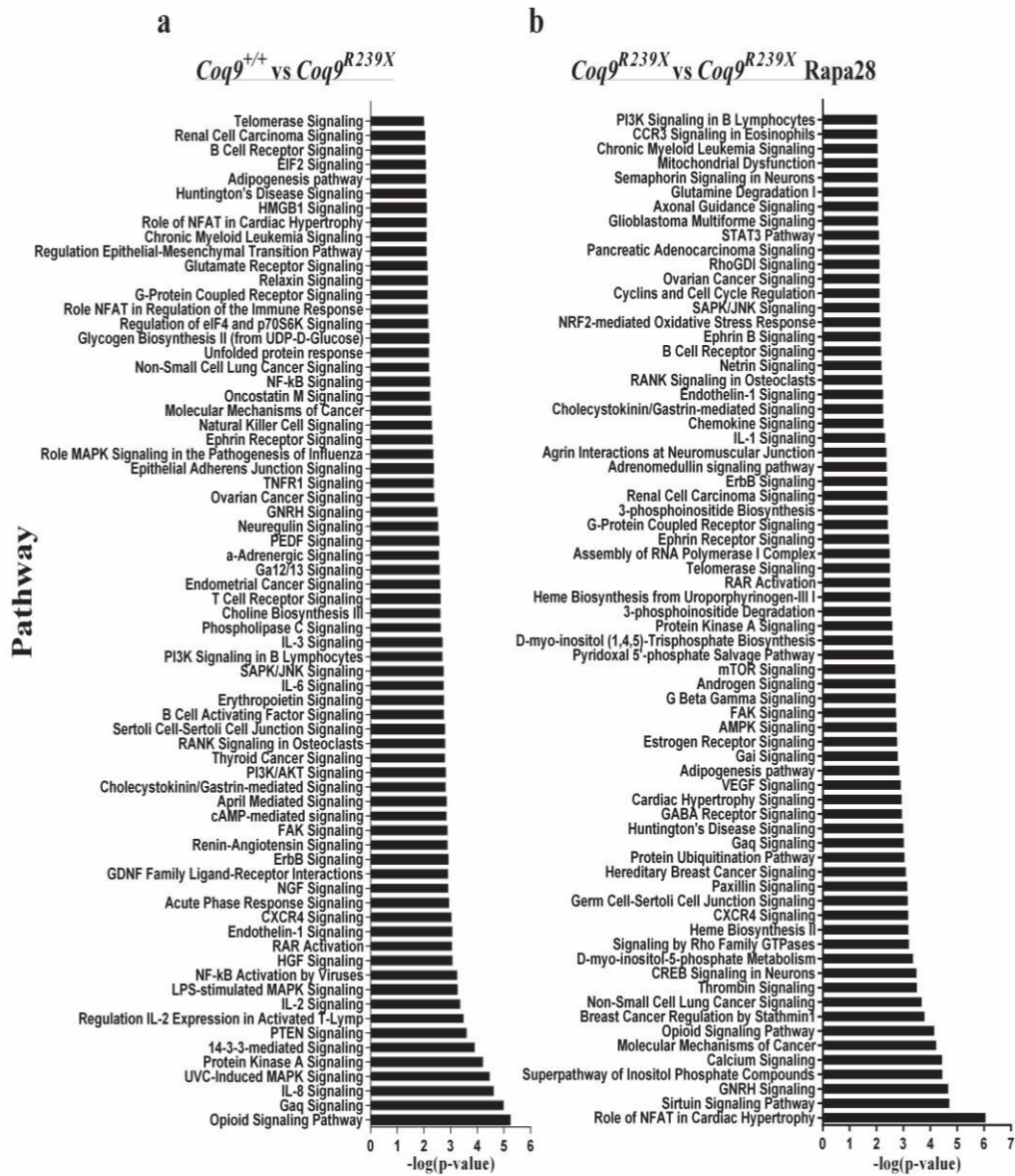
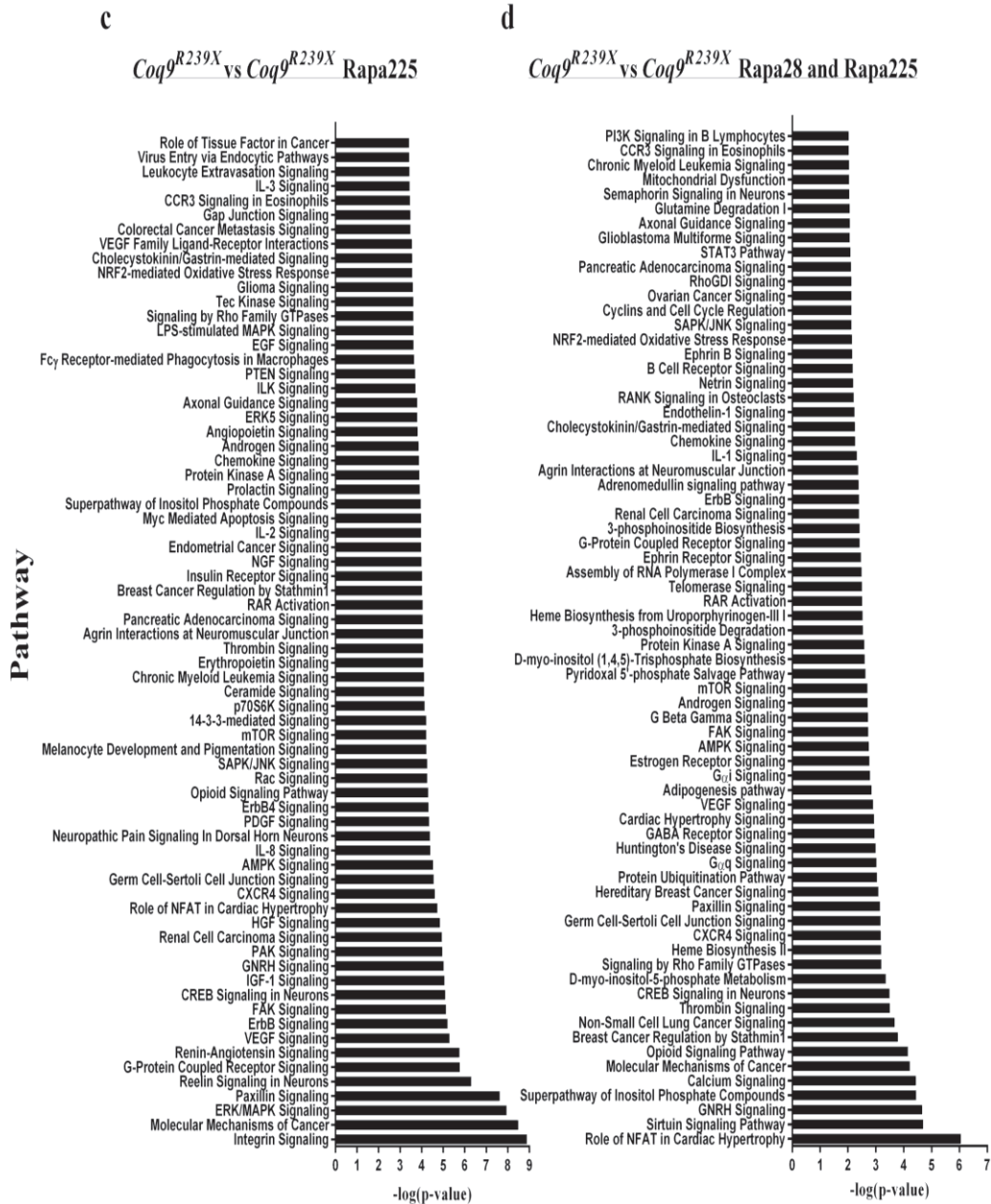


Figura 18. Análisis RNA-seq mediante el software IPA. Efecto de la rapamicina en los sobre las rutas biológicas en la región central del cerebro de los ratones *Coq9*^{R239X}. Solo están representadas las rutas con un valor $-\log(P\text{-value}) \geq 2$, hasta un máximo de 70 de las más significativas. Comparación de procesos biológicos en el cerebro de los ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{R239X} (a); y *Coq9*^{R239X} y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 (b) y 225 ppm (c); y rutas comunes alteradas en los tratamientos a 28 y 225 ppm en relación a los mutantes no tratados (d). Ratones *Coq9*^{+/+}, $n = 7$; *Coq9*^{R239X}, $n = 8$; *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 ppm, $n = 5$; y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 225 ppm, $n = 4$.

Figura 18 (cont.). Análisis RNA-seq mediante el software IPA. Efecto de la rapamicina en los sobre las rutas biológicas en la región central del cerebro de los ratones *Coq9*^{R239X}. Solo están representadas las rutas con un valor $-\log(P\text{-value}) \geq 2$, hasta un máximo de 70 de las más significativas.



Resultados

Estas alteraciones en la expresión génica se reflejaron en cambios en el perfil metabólico de los grupos experimentales. Las principales vías afectadas por el genotipo y/o el tratamiento con rapamicina a dosis baja estaban relacionadas con el metabolismo de lípidos, nucleótidos y aminoácidos, vitaminas, estrés oxidativo, metabolismo de carbohidratos y corticosterona (Fig. 19). Estos cambios fueron más pronunciados en el hígado (Fig. 19b) que en el cerebro (Fig. 19a); destacando especialmente los efectos de la dosis baja de rapamicina sobre el metabolismo de nucleótidos y lípidos en el hígado (Fig. 19b).

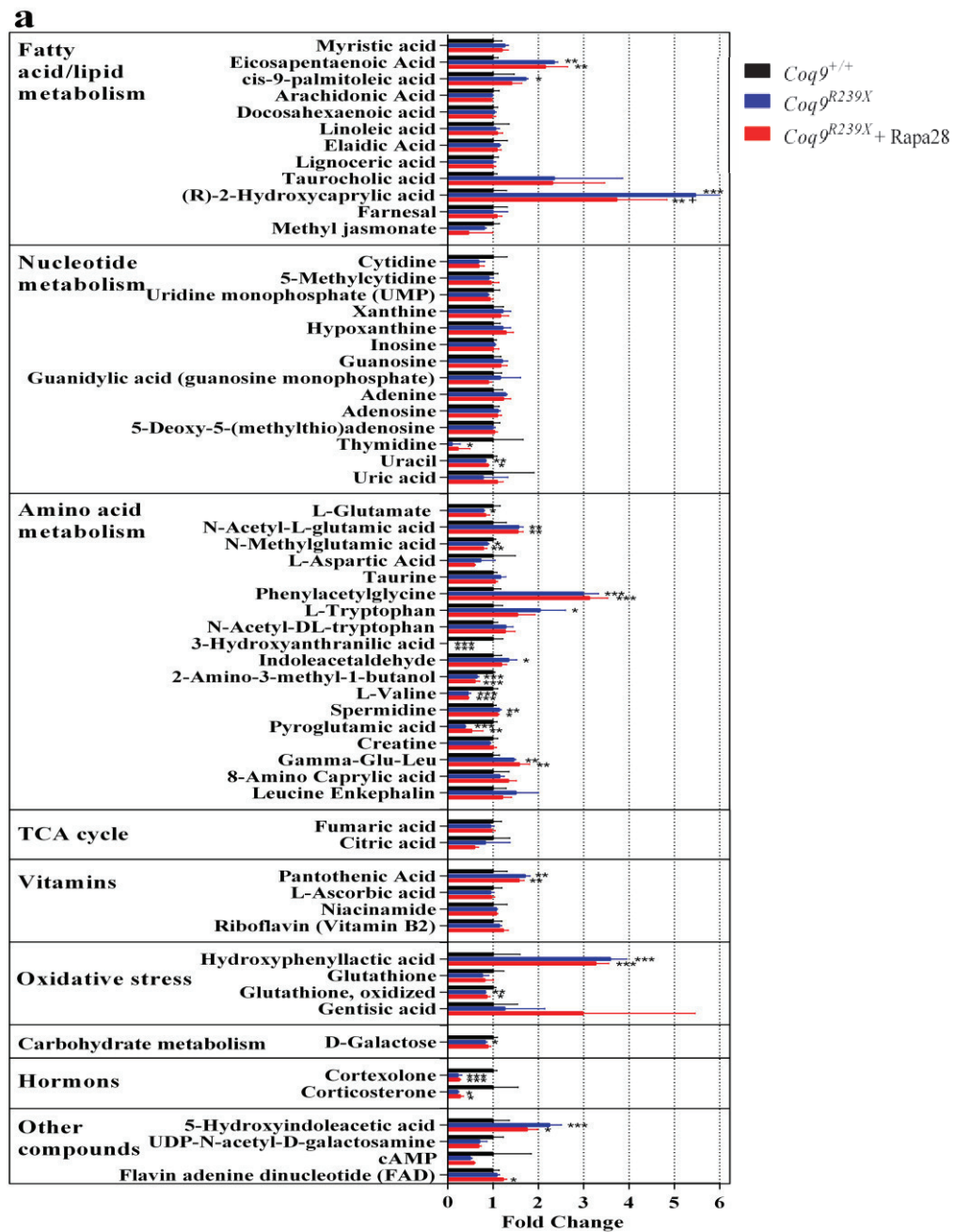
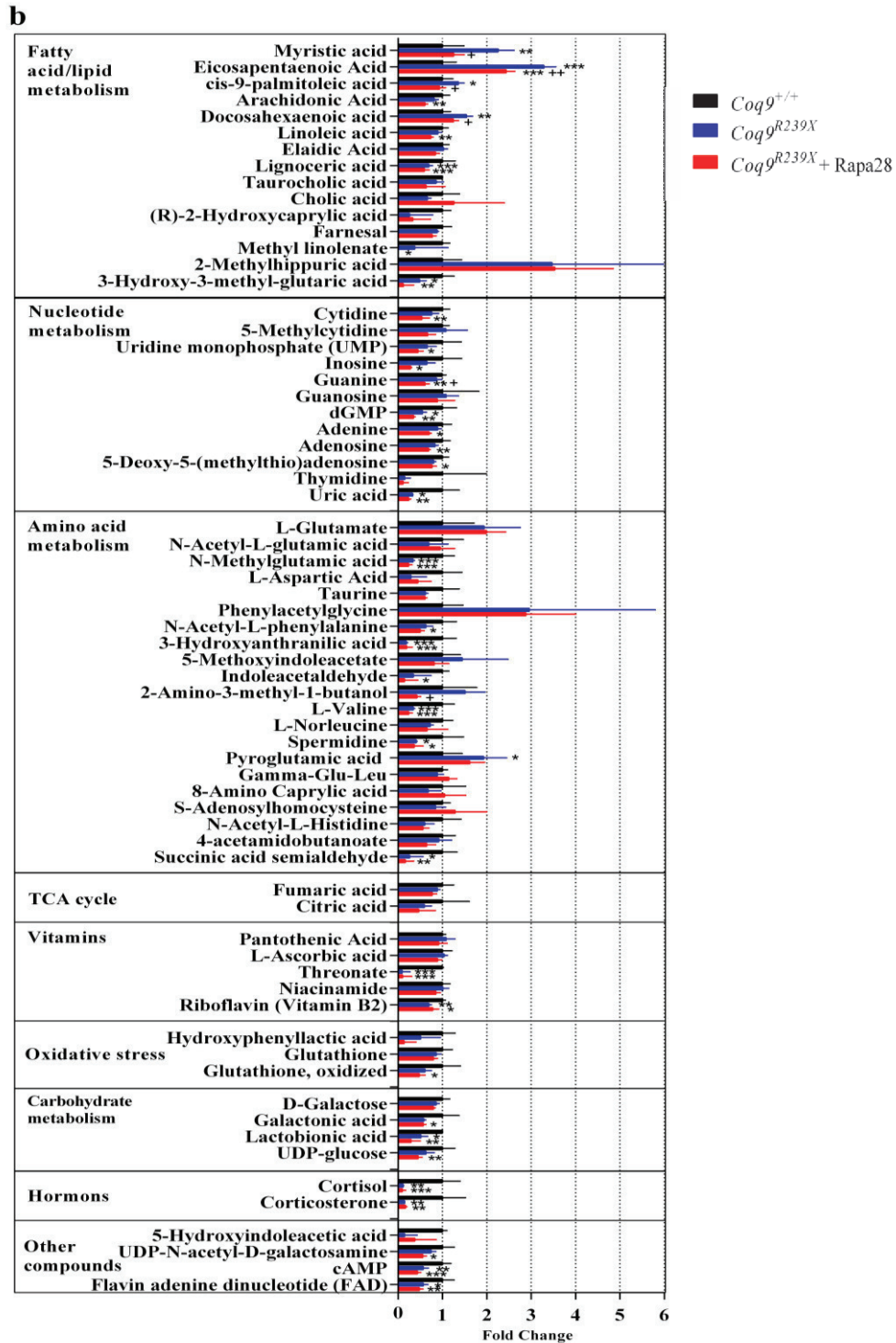


Figura 19. Análisis metabólico. Análisis de los metabolitos en cerebro (a) e hígado(b) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{R239X} y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 ppm. *n* = 4 para cada grupo experimental. Los datos se expresan como la media aritmética ± SD. **P* < 0,05; ***P* < 0,01; *** *P* < 0,001; *Coq9*^{+/+} versus *Coq9*^{R239X} o *Coq9*^{R239X} - 28 ppm. +*P* < 0,05; ++*P* < 0,01; *Coq9*^{R239X} versus *Coq9*^{R239X} - 28 ppm (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

Figura 19 (cont.). Análisis metabólico.



4.1.5 LA RAPAMICINA NO ALTERA LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DE LOS RATONES *Coq9^{R239X}*

Para comprobar si esos cambios en la transcriptómica y metabolómica podrían estar relacionados con alteraciones en la bioenergética mitocondrial, medimos la respiración mitocondrial en los riñones y el cerebro de los ratones, que son los tejidos afectados con una mayor prevalencia en las deficiencias primarias en CoQ. La respiración mitocondrial de los ratones *Coq9^{R239X}* estaba reducida en ambos tejidos, con menor respiración en presencia de ADP y sustratos (Estado 3o) en relación a los ratones *Coq9^{+/+}* (Fig. 20, a y b). El tratamiento con rapamicina tampoco produjo mejoras en este parámetro y la respiración mitocondrial seguía afectada en ambos tejidos en los ratones *Coq9^{R239X}* tras dos meses de tratamiento (Fig. 20, a y b). Acorde con esto, las actividades de los complejos mitocondriales dependientes de CoQ, esto es, CI + CIII y CII + CIII, estaban disminuidas en los riñones y el cerebro de los ratones *Coq9^{R239X}*, y la rapamicina no produjo ningún cambio sobre estas actividades (Fig. 21, a-d). La disminución de la capacidad OXPHOS estimula el metabolismo anaerobio, lo cual se reflejó en la detección de lactato por espectroscopía en el cerebro de los ratones *Coq9^{R239X}* (Fig. 21e). La rapamicina no normalizó el metabolismo energético y la acumulación de lactato en el cerebro seguía detectándose en los ratones mutantes tratados con ambas dosis de rapamicina (Fig. 21e).

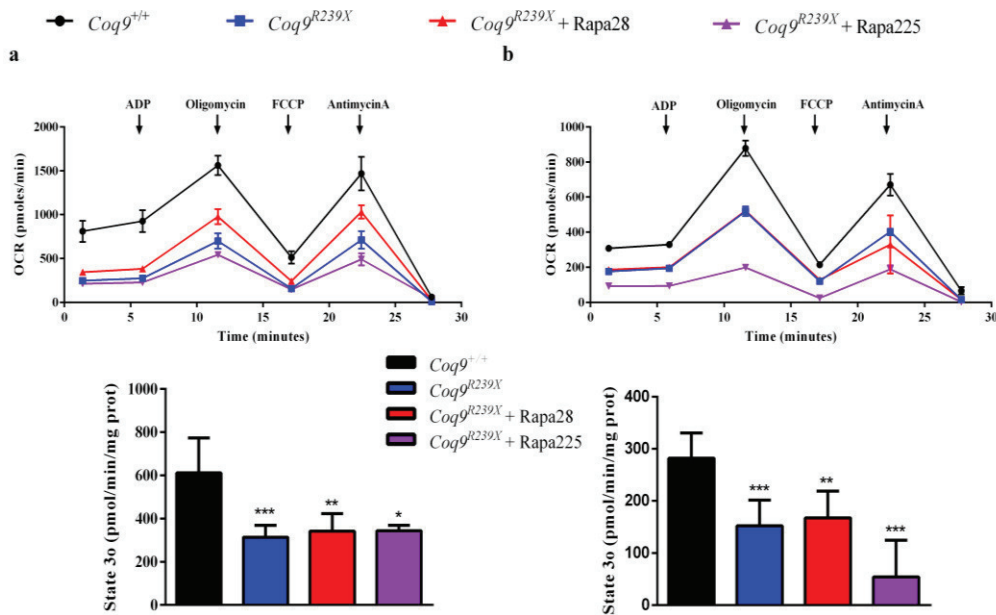


Figura 20. La bioenergética mitocondrial no se ve afectada tras los tratamientos con rapamicina- Respiración mitocondrial. Tasa de consumo de oxígeno (arriba) y respiración estimulada por ADP (Estado 3°, abajo) en presencia de ADP y sustratos en riñón (a) y cerebro (b) de ratones $Coq9^{+/+}$, $Coq9^{R239X}$ y $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 28 y 225 ppm. (a) $Coq9^{+/+}$, $n=3$; $Coq9^{R239X}$, $n=3$; $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 28 ppm, $n=3$; y $Coq9^{R239X}$ tratados con 225 ppm, $n=4$. (b): $Coq9^{+/+}$, $n=3$; $Coq9^{R239X}$, $n=3$; $Coq9^{R239X}$ - 28 ppm, $n=4$; y $Coq9^{R239X}$ - 225 ppm, $n=4$. Los datos se expresan como la media aritmética \pm SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; $Coq9^{+/+}$ versus $Coq9^{R239X}$ o $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

Por tanto, todos estos datos sugerían que la rapamicina no actuaba sobre la capacidad OXPHOS, incluyendo los niveles de CoQ, los cuales estaban reducidos tanto en los ratones mutantes no tratados, como en los tratados con ambas dosis de rapamicina en relación a los niveles de los ratones $Coq9^{+/+}$ (Fig. 22). En este sentido, seguía observándose una acumulación de DMQ, sustrato de la hidroxilasa COQ7 en el complejo de biosíntesis de CoQ, en los ratones $Coq9^{R239X}$ tratados con rapamicina (Fig. 22).

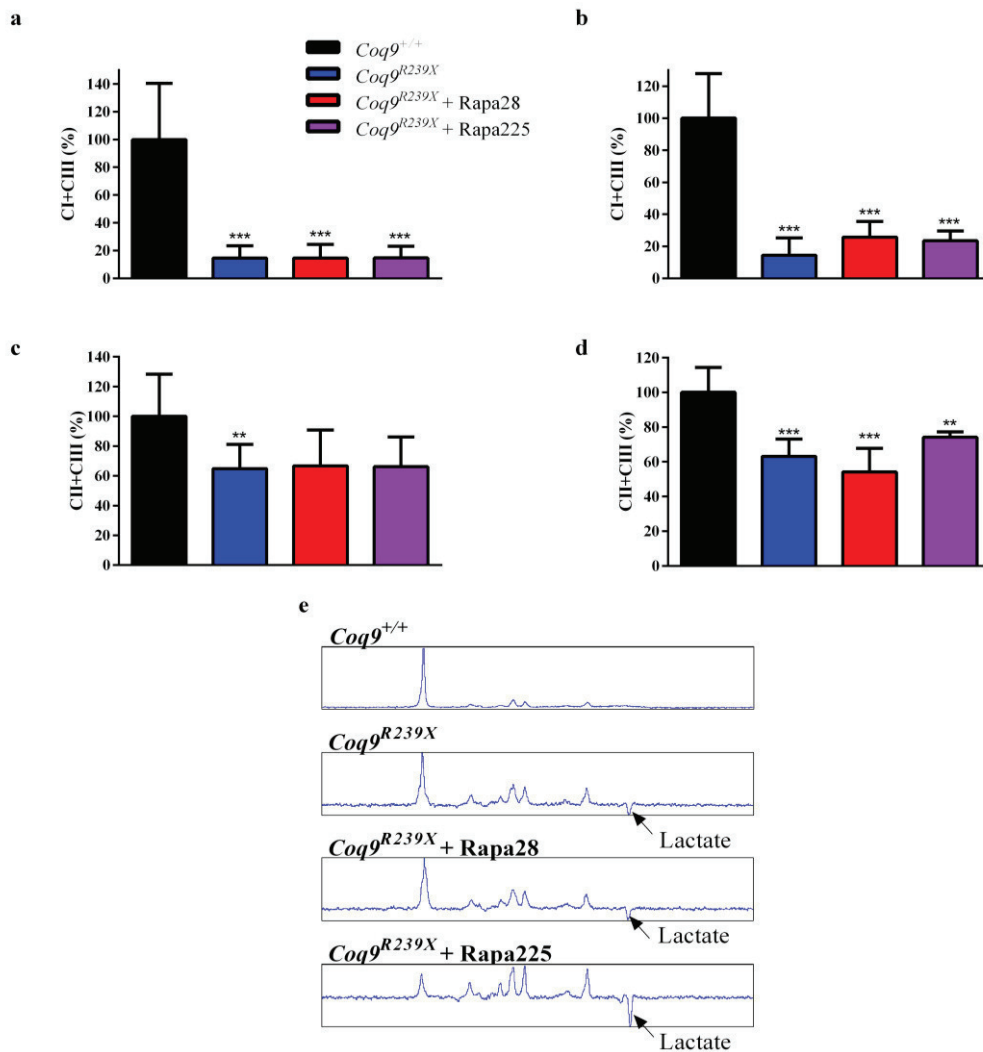


Figura 21. La bioenergética mitocondrial no se ve afectada tras los tratamientos con rapamicina- Actividad de los complejos respiratorios dependientes de CoQ y acumulación de lactato en el cerebro por estimulación del metabolismo anaerobio. Medida de la actividad de CI+CIII y CII+CIII en riñón (a y c, respectivamente) y cerebro (b y d, respectivamente) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{R239X} y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 y 225 ppm. (a) *Coq9*^{+/+}, *n* = 12; *Coq9*^{R239X}, *n* = 11; *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 ppm, *n* = 4; y *Coq9*^{R239X} tratados con 225 ppm, *n* = 4. (b): *Coq9*^{+/+}, *n* = 8; *Coq9*^{R239X}, *n* = 9; *Coq9*^{R239X} - 28 ppm, *n* = 5; y *Coq9*^{R239X} - 225 ppm, *n* = 4. (c) *Coq9*^{+/+}, *n* = 13; *Coq9*^{R239X}, *n* = 12; *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 ppm, *n* = 4; y *Coq9*^{R239X} tratados con 225 ppm, *n* = 4. (d): *Coq9*^{+/+}, *n* = 9; *Coq9*^{R239X}, *n* = 9; *Coq9*^{R239X} - 28 ppm, *n* = 5; y *Coq9*^{R239X} - 225 ppm, *n* = 4. (e) pico de lactato en el cerebro de los ratones *Coq9*^{R239X} y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina. Los datos se expresan como la media aritmética ± SD. ***P* < 0,01; ****P* < 0,001; *Coq9*^{+/+} versus *Coq9*^{R239X} o *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

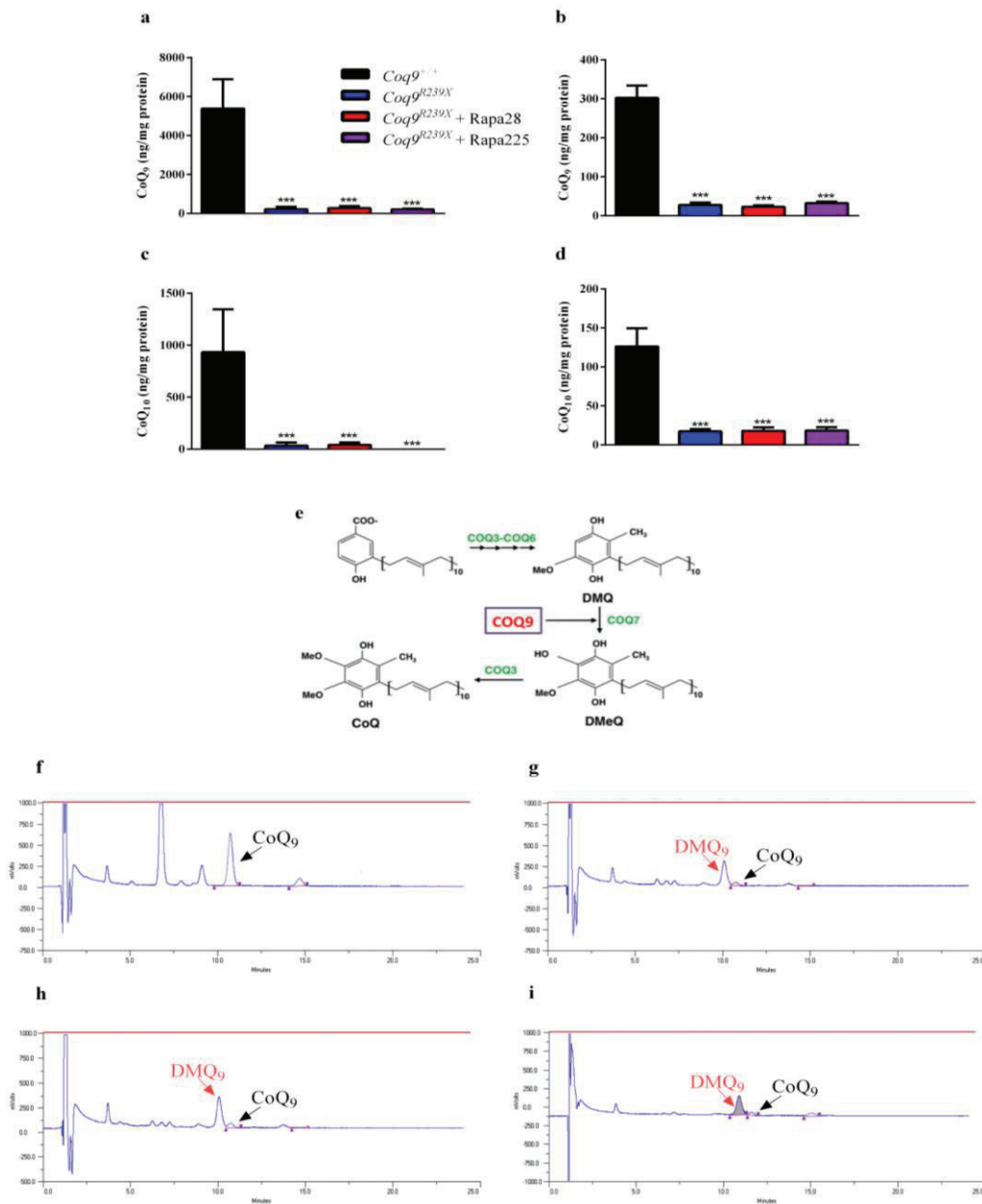


Figura 22. La bioenergética mitocondrial no se ve afectada tras los tratamientos con rapamicina- Niveles de CoQ y acumulación de DMQ Niveles de CoQ₉ y CoQ₁₀ en riñón (a y c, respectivamente) y cerebro (b y d, respectivamente) de ratones *Coq9*^{+/+}, *Coq9*^{R239X} y *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 y 225 ppm. (a, c) *Coq9*^{+/+}, n =9; *Coq9*^{R239X}, n =9; *Coq9*^{R239X} tratados con rapamicina a 28 ppm, n =5; y *Coq9*^{R239X} tratados con 225 ppm, n =5. (b, d): *Coq9*^{+/+}, n =8; *Coq9*^{R239X}, n =9; *Coq9*^{R239X} - 28 ppm, n =6; y *Coq9*^{R239X} - 225 ppm, n =5. (e) Representación esquemática del paso de biosíntesis de CoQ donde interviene la proteína COQ9. La hidroxilasa COQ7 necesita a COQ9 para la hidroxilación de DMQ a DMeQ y, por tanto, la disfunción de COQ7 o COQ9 resultan en la

Eliana Barriocanal Casado

acumulación de DMQ. (f-i) Cromatogramas representativos de las quinonas en el riñón de los ratones *Coq9^{+/+}* (f), *Coq9^{R239X}* (g) y *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 28 (h) y 225 ppm (i). Los datos se expresan como la media aritmética \pm SD. *** $P < 0,001$; *Coq9^{+/+}* versus *Coq9^{R239X}* o *Coq9^{R239X}* tratados con rapamicina a 28 o 225 ppm. (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

4.1.6 LA MODULACIÓN DE LAS VÍAS *DOWNSTREAM* DE mTORC1

TAMPOCO TIENE EFECTO TERAPÉUTICO EN LOS RATONES

Coq9^{R239X}

Dado que la inhibición de mTOR tiene efectos pleiotrópicos y podría estar induciendo efectos secundarios que enmascarasen su potencial terapéutico en el modelo *Coq9^{R239X}*, nos planteamos realizar un estudio piloto de tratamiento con dos moléculas que actúan sobre vías específicas aguas abajo de mTORC1: la trehalosa, que puede inducir autofagia de manera independiente de mTORC1 y actuar como neuroprotector, tal como se ha descrito en algunas enfermedades neurodegenerativas (X. Zhang et al., 2014); y el PF-4708671, que inhibe la síntesis de lípidos y proteínas a través de la inhibición específica de S6K (Pearce et al., 2010).

El tratamiento con trehalosa no produjo cambios en las manifestaciones histopatológicas en el puente de los ratones *Coq9^{R239X}* (Fig. 23, a5-a6, b5-b6), ya que la astrogliosis y la espongirosis eran similares a lo observado en los ratones mutantes no tratados (Fig. 23, a3-a4, b3-b4), mientras que estas características no aparecían en los ratones *wild-type* (Fig. 23, a1-a2, b1-b2). La actividad de los complejos dependientes de CoQ, CI + CIII y CII + CIII,

estaba reducida tanto en los ratones mutantes no tratados, como en los tratados con trehalosa, en relación a los ratones *Coq9*^{+/+}, tanto en los riñones (Fig. 23, c y e) como en el cerebro (Fig. 23, d y f).

De igual manera, la espongiosis y astrogliosis se mantenían tras el tratamiento con PF-4708671 en el puente de los ratones *Coq9*^{R239X} (Fig. 23, g5-g6, h5-h6), tal como podía observarse comparando las imágenes con las de los ratones *Coq9*^{R239X} no tratados (Fig. 23, g3-g4, h3-h4) y los ratones *Coq9*^{+/+} (Fig. 23, g1-g2, h1-h2). La inmunohistoquímica para la detección de microglía no reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 23, i1-i6). Igualmente, la respiración mitocondrial tampoco se vio afectada por el tratamiento, y los ratones *Coq9*^{R239X} y *Coq9*^{R239X} tratados con PF-4708671 mostraron una disminución en la respiración mitocondrial en comparación con los ratones *Coq9*^{+/+}, tanto en los riñones (Fig. 23, j y k), como en el cerebro (Fig. 23, l y m).

Por tanto, ninguno de los tratamientos mostró mejoras en las características histopatológicas ni en la bioenergética de los ratones *Coq9*^{R239X} (Fig. 23), lo cual se vio reflejado en el estudio piloto de supervivencia para ambos tratamientos (datos no mostrados).

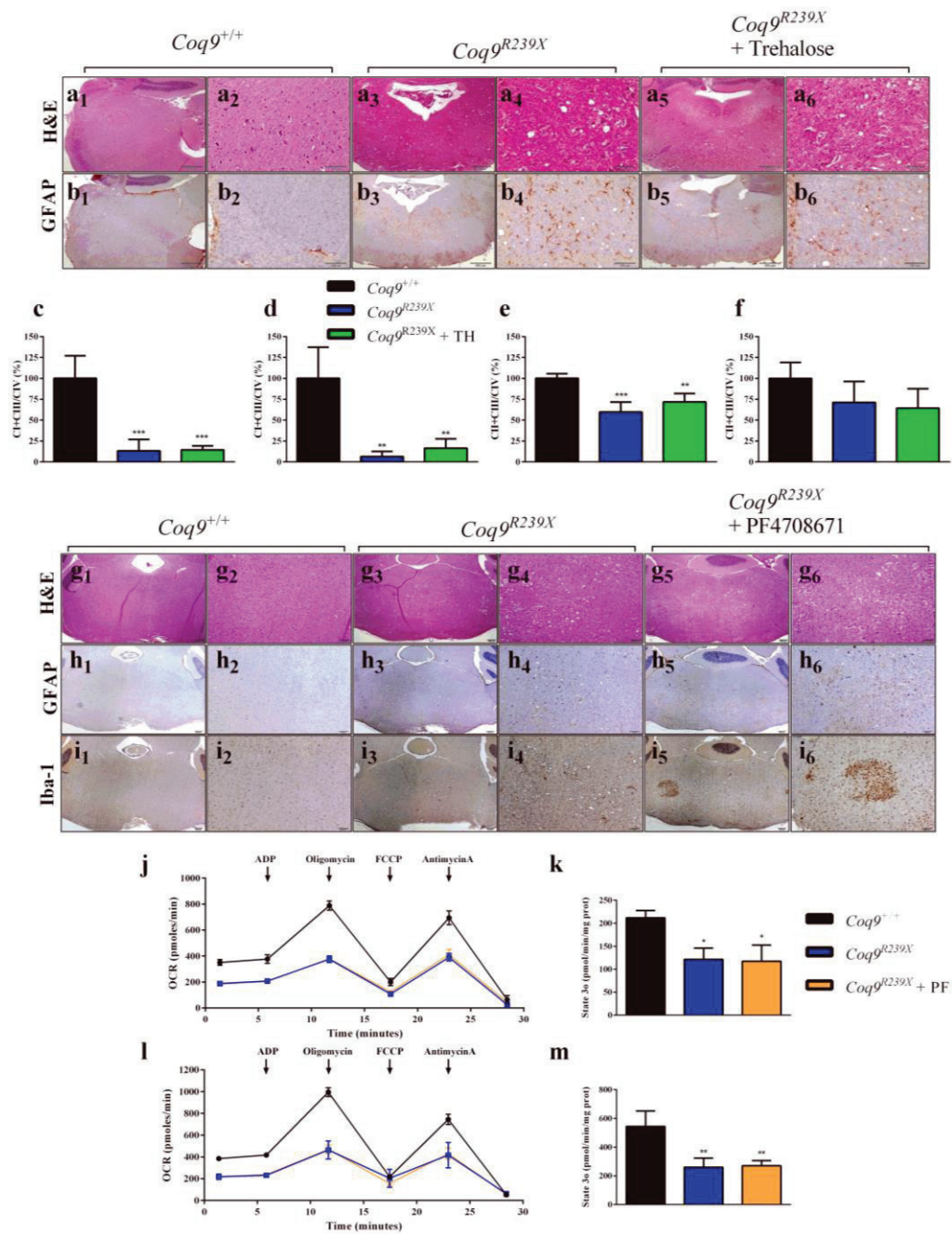


Figura 23. Evaluación de otras terapias para los ratones *Coq9^{R239X}* basadas en la modulación de las vías aguas abajo de mTOR. (a₁-a₆) Tinción hematoxilina-eosina en el puente de ratones *Coq9^{+/+}* (a₁ y a₂), *Coq9^{R239X}* (a₃ y a₄) y *Coq9^{R239X}* tratados con trehalosa (a₅ y a₆). (b₁-b₆) Tinción anti-GFAP en el puente de ratones *Coq9^{+/+}* (b₁ y b₂), *Coq9^{R239X}* (b₃ y b₄), y *Coq9^{R239X}* tratados con trehalosa (b₅ y b₆). (c-f) Actividades de complejos dependientes de CoQ CI + CIII y CII + CIII en cerebro (c y e, respectivamente) y riñón (d y f,

respectivamente). (g₁-g₆) Tinción hematoxilina-eosina en el puente de ratones *Coq9*^{+/+} (g₁ y g₂), *Coq9*^{R239X} (g₃ y g₄), y *Coq9*^{R239X} tratados con PF-4708671 (g₅ y g₆). (h₁ to h₆) Tinción anti-GFAP en el puente de ratones *Coq9*^{+/+} (h₁ y h₂), *Coq9*^{R239X} (h₃ y h₄), y *Coq9*^{R239X} tratados con PF-4708671 (h₅ y h₆). (i₁- i₆) Tinción anti-Iba-1 en el puente de ratones *Coq9*^{+/+} (i₁ y i₂), *Coq9*^{R239X} (i₃ y i₄), y *Coq9*^{R239X} tratados con PF-4708671 (i₅ y i₆). (j-m) Respiración mitocondrial en ratones *Coq9*^{R239X} tratados con PF-4708671 medida por la tasa de consumo de oxígeno y el estado 3o en cerebro (j y k, respectivamente) y riñón (l y m, respectivamente). Barras de escala: 500 μm (a₁, b₁, a₃, b₃, a₅, b₅); 100 μm (a₂, b₂, a₄, b₄, a₆, b₆); 500 μm (g₁, h₁, i₁, g₃, h₃, i₃, g₅, h₅, i₅); 100 μm (g₂, h₂, i₂, g₄, h₄, i₄, g₆, h₆, i₆). Los datos se expresan como la media aritmética ± SD. **P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,001; *Coq9*^{+/+} versus *Coq9*^{R239X} o *Coq9*^{R239X} tratados con trehalosa o PF-4708671. (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

4.2 TERAPIA GÉNICA: RESTAURACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE

Coq9

En paralelo a la intervención metabólica, se desarrollaron dos estrategias de intervención mediante terapia génica con la finalidad de aportar la proteína corregida a los tejidos más afectados por la deficiencia en CoQ. Las dos estrategias consistían en: 1) la utilización de células como sistema de transporte capaces de hacer llegar la proteína corregida a los diferentes tejidos afectados (*ex vivo*); y 2) la inoculación directa de vectores que expresen la proteína correcta (*in vivo*).

4.2.1 TERAPIA *EX VIVO*: DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA PARA EL TRATAMIENTO DE RATONES *Coq9*^{R239X} MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE mHSCs SOBREENPRESANDO *Coq9*

Esta estrategia requiere la optimización de al menos dos procedimientos para su éxito: 1) lograr sobreexpresar la proteína COQ9 en las células que

Eliana Barriocanal Casado

derivan de HSCs; 2) lograr un buen injerto con alto grado de repoblación de las HSCs. Además, es necesario que la proteína COQ9 y/o los metabolitos generados a partir de su actividad sean capaces de corregir células diana y células adyacentes (corrección cruzada o cros-corrección). Por tanto, para abordar esta fase de la Tesis, en primer lugar se pusieron a punto los protocolos para lograr la sobreexpresión y la repoblación, y finalmente se abordó el tratamiento de los ratones.

4.2.1.1 Sobreexpresión de proteína COQ9 funcional y análisis de la capacidad de corrección

4.2.1.1.1 Los vectores lentivirales CCoq9WP sobreexpresan COQ9 en mHSCs

Primeramente, generamos un vector lentiviral (LV) que expresaba *Coq9* a través del promotor fuerte CMV mediante la inserción del cDNA de *Coq9* en el esqueleto del vector CEWP disponible en el laboratorio (Benabdellah et al., 2011) (ver material y métodos para más detalles). Para evaluar su eficacia en la expresión de COQ9, se transdujeron fibroblastos embrionarios (MEFs) y mHSCs derivados de ratones *Coq9*^{R239X} con partículas LVs CCoq9WP a distintas multiplicidades de infección (MOI) y analizamos si las células transducidas eran capaces de producir niveles suprafisiológicos del mRNA de *Coq9* y de la proteína COQ9 (Fig. 24). En ambos modelos celulares, la

transducción con los vectores CCoq9WP produjo niveles de mensajero *Coq9* de 100-700 veces más que los niveles observados en sus correspondientes células control *Coq9*^{+/+} (Fig. 24, a y b).

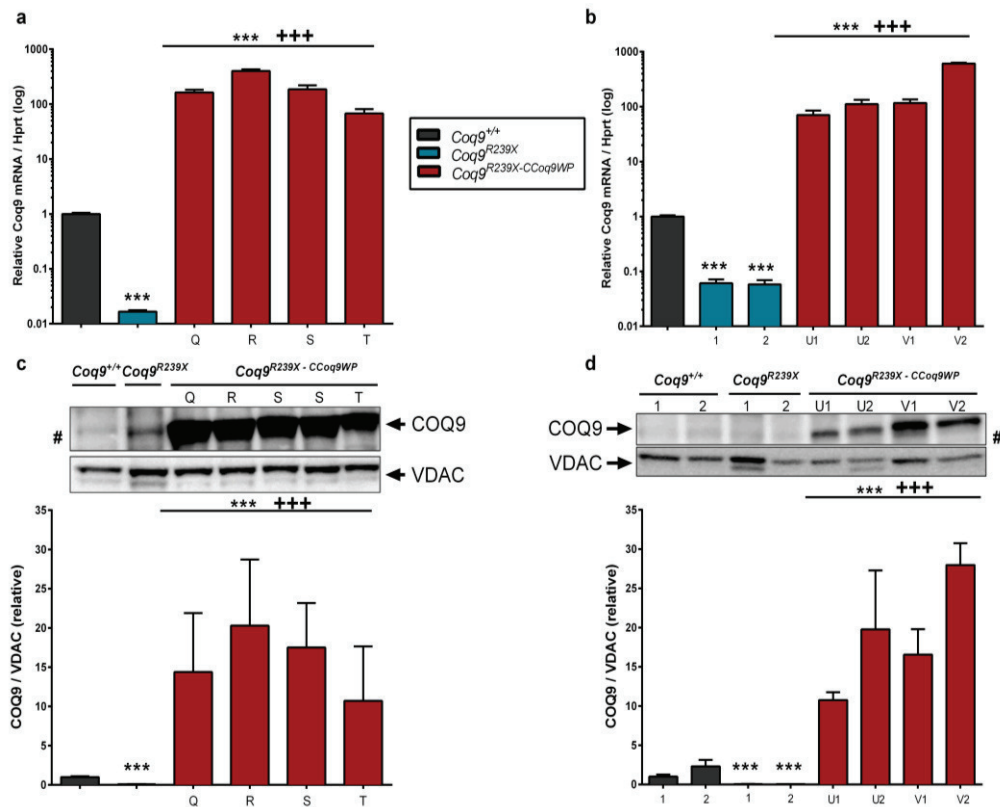


Figura 24. La transducción con el vector CCoq9WP aumenta los niveles de mRNA de *Coq9* y de proteína COQ9 en MEFs y mHSCs *Coq9*^{R239X}. Niveles de mRNA de *Coq9* en MEFs (a) y mHSCs (b). Niveles de proteína COQ9 en MEFs (c) y mHSCs (d). MEFs: Q: 1 Hit de vectores, 200 μ l, no concentrados; R: 1 Hit de vectores, 100 μ l, concentrados 10x; S: 1 Hit de vectores, 25 μ l, concentrados 10x; T: 1 Hit de vectores, 5 μ l, concentrados 10x. mHSCs: U: 1 Hit de vectores, 400 μ l, concentrados 23,5x; V: 2 Hits de vectores, 400 μ l, concentrados 23,5x; 1: 7-9 días post-transducción de mHSCs; 2: 12-16 días post-transducción en mHSCs. Los datos se expresan como la media aritmética \pm SD. *** $P < 0,001$; células *Coq9*^{+/+} versus *Coq9*^{R239X} o *Coq9*^{R239X}-CCoq9WP. +++ $P < 0,001$ células *Coq9*^{R239X} versus *Coq9*^{R239X}-CCoq9WP. ($n = 4-6$ para cada grupo) (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey). # banda inespecífica detectada en las células *Coq9*^{R239X} con el anticuerpo anti-COQ9.

Eliana Barriocanal Casado

Esto se tradujo en unos niveles de proteína entre 10 y 30 veces mayor en las células *Coq9*^{R239X} transducidas respecto a sus controles *Coq9*^{+/+} (Fig. 24, c y d). Por tanto, los vectores CCoq9WP eran capaces de incrementar el mRNA de *Coq9* y los niveles de proteína COQ9 sobre los valores de las células control en MEFs y, más importante, en las células diana de la estrategia terapéutica, las mHSCs, de ratones *Coq9*^{R239X}.

4.2.1.1.2 La sobreexpresión de COQ9 restaura la función de la ruta de biosíntesis en MEFs y mHSCs procedentes de ratones *Coq9*^{R239X}

La proteína COQ9 es necesaria para la estabilidad y actividad funcional de la hidroxilasa COQ7 (García-Corzo et al., 2013; Luna-Sánchez et al., 2015). Por ello, los ratones *Coq9*^{R239X} muestran una reducción muy severa en los niveles de COQ7 y acumulación de DMQ₉ (sustrato de COQ7) en los tejidos. Este mismo patrón se observó en los MEFs y las mHSCs procedentes de los ratones *Coq9*^{R239X} (Fig. 25, a y b; Fig 26). La sobreexpresión de la proteína COQ9 en los MEFs y mHSCs transducidos con el vector produjo un incremento en los niveles de la proteína COQ7, los cuales fueron incluso superiores a los observados en las células control (Fig. 25, a y b).

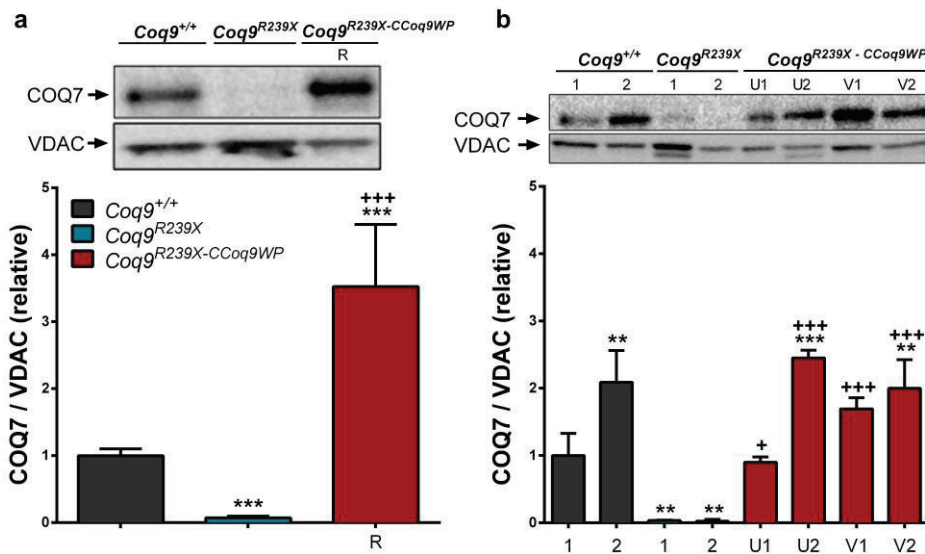


Figura 25. La sobreexpresión de COQ9 en MEFs y mHSCs de ratones *Coq9*^{R239X} aumenta los niveles de COQ7. Niveles de COQ7 en MEFs (a) y mHSCs (b). MEFs: R: 1 Hit de vectores, 100 μ l, concentrados 10x. mHSCs: U: 1 Hit de vectores, 400 μ l, concentrados 23,5x; V: 2 Hits de vectores, 400 μ l, concentrados 23,5x; 1: 7-9 días post-transducción de mHSCs; 2: 12-16 días post-transducción en mHSCs. Los datos se expresan como la media aritmética \pm SD. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, células *Coq9*^{+/+} versus *Coq9*^{R239X} o *Coq9*^{R239X-CCoq9WP}. +++ $P < 0,001$, células *Coq9*^{R239X} versus *Coq9*^{R239X-CCoq9WP}. ($n = 4-6$ para cada grupo) (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

Como resultado, no se acumuló DMQ₉ en las células transducidas con los LV-CCoq9WP (Fig. 26, b-e; Fig. 27, b-e) y se normalizaron los niveles de CoQ₉ (Fig. 26a y 27a). Además se observó que los niveles de las proteínas COQ9 y COQ7 y de lípido CoQ₉ iban incrementándose con el tiempo en cultivo de las mHSCs, siendo más alto en el segundo tiempo de recogida de las células (tras 12-16 días en cultivo), que en el primero (a los 7-9 días de cultivo), tanto en las células *Coq9*^{+/+}, como en las *Coq9*^{R239X} transducidas con

el vector CCoq9WP (Fig. 25b; Fig. 27a; Tabla 3). Esto se produjo en paralelo a una diferenciación de las mHSCs a lo largo del tiempo en cultivo (Fig. 28).

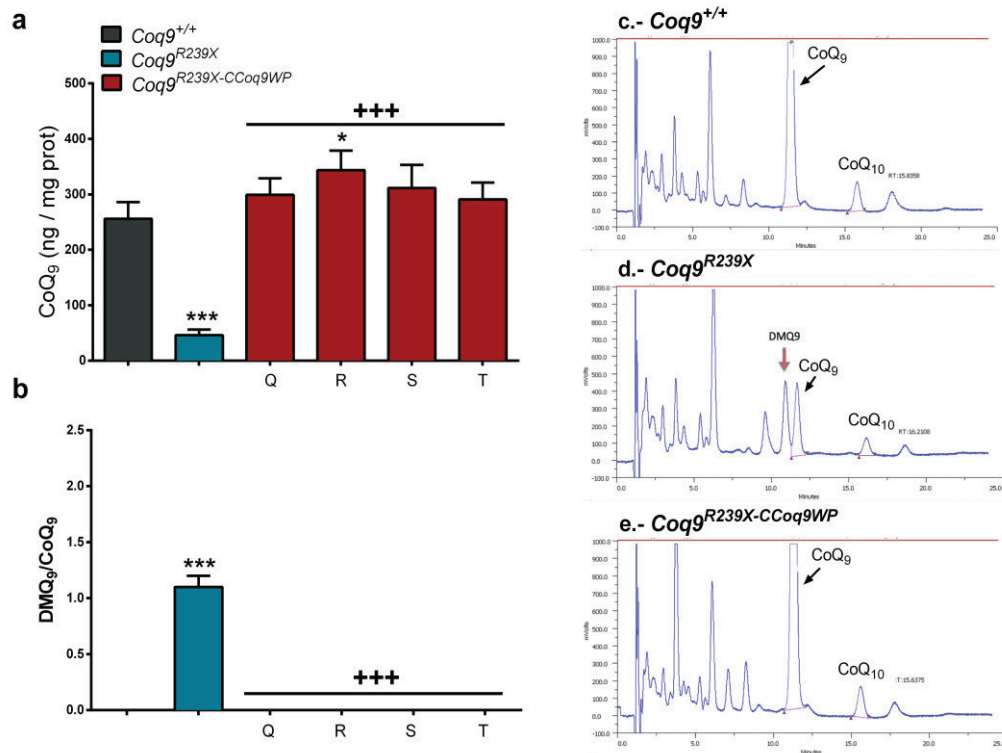


Figura 26. Eliminación de DMQ₉ e incremento de CoQ₉ en MEFs *Coq9*^{R239X} transducidos con el vector CCoq9WP. Niveles de CoQ₉ (a) y ratio DMQ₉/CoQ₉ (b) en MEFs. (c-e) cromatogramas representativos de los tres grupos experimentales. Q: 1 Hit de vectores, 200 μ l, no concentrados; R: 1 Hit de vectores, 100 μ l, concentrados 10x; S: 1 Hit de vectores, 25 μ l, concentrados 10x; T: 1 Hit de vectores, 5 μ l, concentrados 10x. Los datos se expresan como la media aritmética \pm SD. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, células *Coq9*^{+/+} versus *Coq9*^{R239X} o *Coq9*^{R239X-CCoq9WP}. +++ $P < 0,001$, células *Coq9*^{R239X} versus *Coq9*^{R239X-CCoq9WP}. ($n = 4-6$ para cada grupo) (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

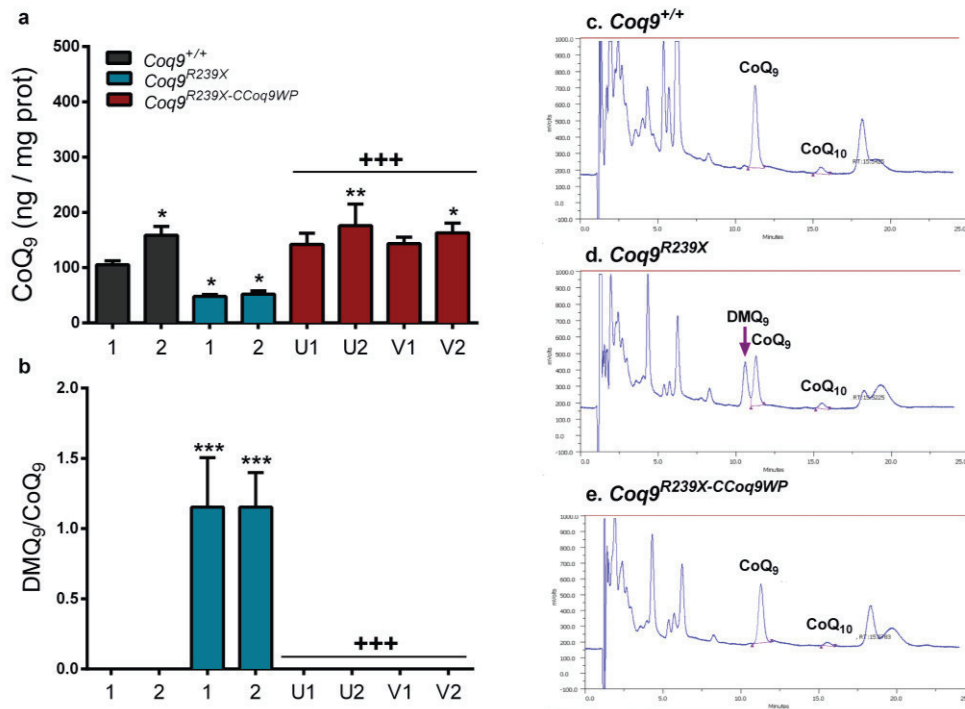


Figura 27. Eliminación de DMQ₉ e incremento de CoQ₉ en mHSCs *Coq9*^{R239X} transducidas con el vector CCoq9WP. Niveles de CoQ₉ (a) y ratio DMQ₉/CoQ₉ (b) en mHSCs. (c-e) cromatogramas representativos de los tres grupos experimentales. U: 1 Hit de vectores, 400 µl, concentrados 23,5x; V: 2 Hits de vectores, 400 µl, concentrados 23,5x; 1: 7-9 días post-transducción de mHSCs; 2: 12-16 días post-transducción en mHSCs. Los datos se expresan como la media aritmética ± SD. **P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,001, células *Coq9*^{+/+} versus *Coq9*^{R239X} o *Coq9*^{R239X-CCoq9WP}. +++ *P* < 0,001, células *Coq9*^{R239X} versus *Coq9*^{R239X-CCoq9WP}. (*n* = 4-6 para cada grupo) (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

	U1	U2	V1	V2
<i>Coq9</i> mRNA	70 ± 15	111 ± 22 #	117 ± 19	609 ± 23 ###
COQ9	11 ± 1	20 ± 7.5	17 ± 3.2	28 ± 2.8 #
COQ7	0.9 ± 0.08	2.5 ± 0.12 ###	1.7 ± 0.17	2 ± 0.43
CoQ₉	142 ± 20	176 ± 39	143 ± 12	163 ± 18

Tabla 3. Efecto del tiempo sobre los niveles de las biomoléculas analizadas en las mHSCs transducidas con el vector CCoq9WP. U: 1 Hit de vectores, 400 µl, concentrados 23,5x; V: 2 Hits de vectores, 400 µl, concentrados 23,5x; 1: 7-9 días post-transducción de mHSCs; 2: 12-16 días post-transducción en mHSCs. Se comparó el efecto del tiempo en cultivo, es decir, U1 versus U2, y V1 versus V2, mediante análisis t-test. Los datos se expresan como la media aritmética ± SD. #*P* < 0,05; ###*P* < 0,001. (*n* = 4-6 para cada grupo).

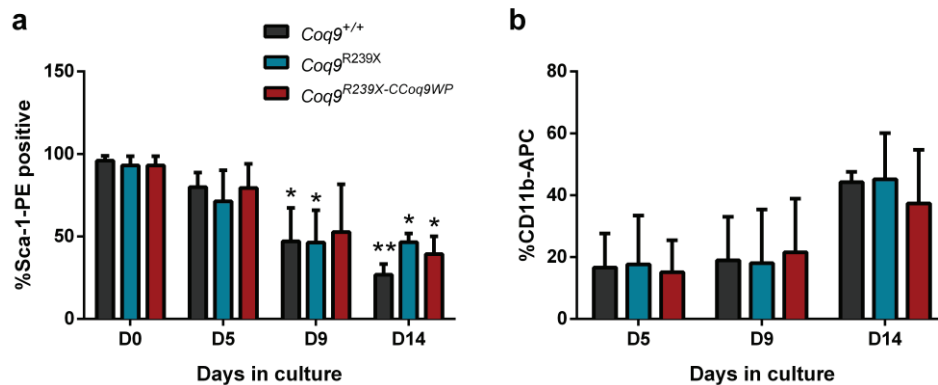


Figura 28. Caracterización del crecimiento de las mHSCs durante 14 días de cultivo. Porcentaje de células positivas para el marcador de HSCs Sca-1 (a) y para el marcador de macrófagos CD11b (b) medidos por citometría. Los datos se expresan como la media aritmética \pm SD. Se comparan todos los grupos experimentales a los distintos tiempos frente a las células *Coq9*^{+/+} a día 0. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. ($n = 4$ para cada grupo y punto de tiempo) (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey)

4.2.1.1.3 La sobreexpresión de COQ9 normaliza la función mitocondrial y mejora el crecimiento de los MEFs *Coq9*^{R239X}

Los fibroblastos de pacientes con deficiencia primaria en CoQ₁₀ muestran actividades reducidas de los complejos mitocondriales dependientes de CoQ y déficit en los niveles de ATP (Danhauser et al., 2016; López et al., 2010; Quinzii et al., 2010; Quinzii et al., 2008). De igual manera, las mitocondrias aisladas de los tejidos del modelo de ratón *Coq9*^{R239X} manifiestan una disminución en la respiración mitocondrial, por lo que analizamos si ese incremento de CoQ₉ inducía cambios funcionales en la bioenergética mitocondrial. Para ello, evaluamos la respiración mitocondrial en los MEFs a través del analizador SeaHorse. Los MEFs *Coq9*^{R239X} mostraron un descenso

global en la tasa de consumo de oxígeno y en la capacidad respiratoria de reserva (*spare respiratory capacity*) (Fig. 29, a y b). Ambos parámetros se normalizaron tras la transducción de los MEFs con el LV CCoq9WP (Fig. 29, a y b). Asimismo, se observó que la transducción con el vector CCoq9WP aumentó el crecimiento celular de los MEFs en relación a los MEFs *Coq9*^{R239X} no transducidos y a los *wild-type* (Fig. 29c). Esta mejora en el crecimiento celular estaba limitada a las primeras horas tras la siembra en cultivo, indicando que la sobreexpresión de COQ9 podría mejorar la adhesión de los MEFs al plástico y esto podría favorecer el crecimiento inicial en cultivo (cuadro verde Fig. 29c). Pasadas unas horas, la tasa de crecimiento fue similar en los tres grupos experimentales (Fig. 29c)

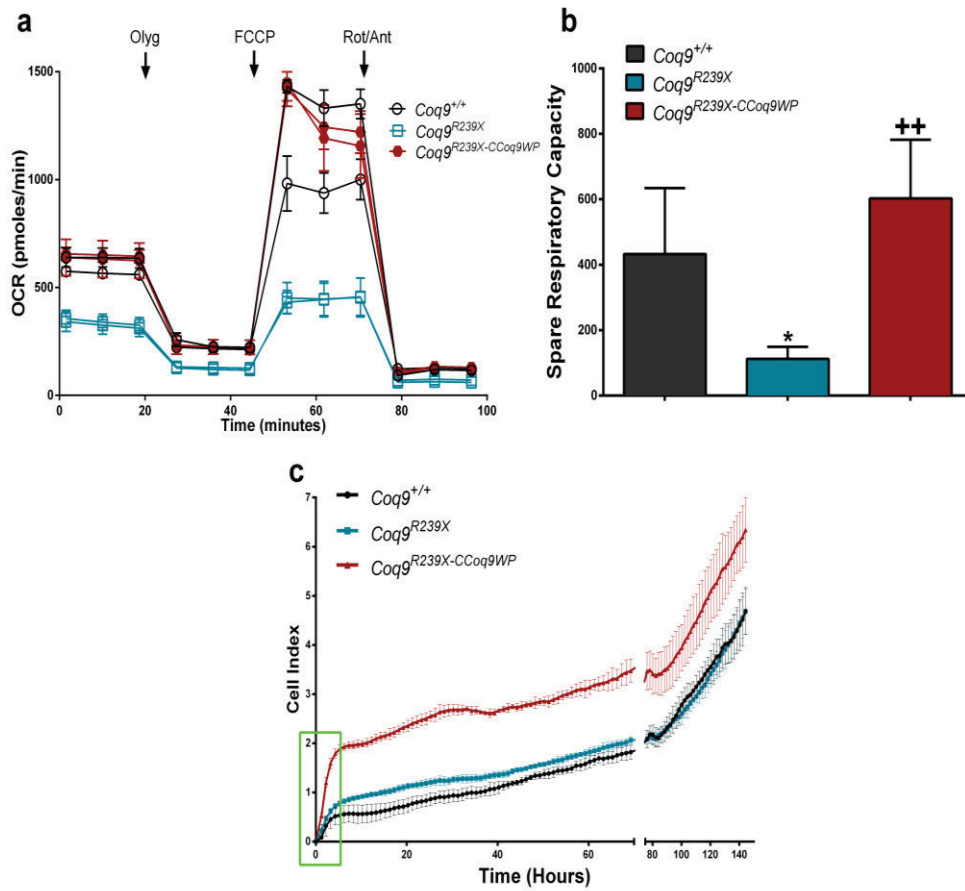


Figura 29. La transducción con el LV CCoq9WP restaura la respiración mitocondrial y potencia el crecimiento celular de los MEFs derivados de ratones $Coq9^{R239X}$. Perfil del consumo de oxígeno (a), capacidad respiratoria de reserva (b), e índice celular (c) en MEFs. Las flechas verticales indican el momento de adición de oligomicina (olyg), FCCP y rotenona/antimicina (rot/ant). Los datos se expresan como la media aritmética \pm SD. * $P < 0,05$, células $Coq9^{+/+}$ versus $Coq9^{R239X}$ o $Coq9^{R239X-CCoq9WP}$. ++ $P < 0,01$, células $Coq9^{R239X}$ versus $Coq9^{R239X-CCoq9WP}$. ($n = 4-6$ para cada grupo) (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

4.2.1.2 Repoblación de los tejidos de los ratones *Coq9*^{R239X} con células mHSCs/CCoq9WP

4.2.1.2.1 El busulfán produce ablación de la médula ósea permitiendo una colonización de las mHSCs donantes en los tejidos de los ratones *Coq9*^{R239X}

Comprobada la eficacia *in vitro* del vector CCoq9WP para sobreexpresar *Coq9* y reparar los defectos de las células procedentes del modelo murino *Coq9*^{R239X}, el siguiente paso era trasladarlo a la terapia sobre el modelo animal. Para ello, primero era necesario poner a punto un protocolo para conseguir que las mHSCs y su progenie fueran capaces de repoblar eficazmente los tejidos afectados por la patología. Varios estudios establecían la preferencia de un régimen de mieloablación basado en el busulfán frente a la irradiación a fin de conseguir un buen acondicionamiento (eliminación de células del receptor) tanto en médula como en los diferentes tejidos, incluyendo el cerebro (Capotondo et al., 2012; Wilkinson et al., 2013). El cerebro es uno de los órganos más difíciles de acceder y donde el efecto de esta deficiencia es más severo. Lograr que la microglía del SNC de los ratones receptores sea reemplazada por microglía procedente de las HSCs donantes es por tanto un aspecto crucial en el éxito de esta estrategia, tal y como ocurre en otras patologías que involucran el SNC (Capotondo et al., 2012; Wilkinson et al., 2013). De acuerdo a lo descrito en la literatura,

Eliana Barriocanal Casado

probamos dos dosis de busulfán diferentes en los ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{R239X}*: 100 mg/kg y 125 mg/kg, repartidas en dosis de 25 mg/kg/día, en 4 o 5 días, respectivamente. Dado que no se observaron diferencias entre genotipos en los parámetros de respuesta al busulfán analizados, los datos obtenidos de ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{R239X}* fueron tratados conjuntamente para estas medidas. El hemograma mostró una depleción general de los componentes sanguíneos, tanto a la dosis de 100 mg/kg de busulfán, como a la dosis de 125 mg/kg, a los 15 días después de la última inyección de busulfán en relación a los inyectados con el vehículo de la droga (Fig. 30, b-h; Tabla 4). Sin embargo, la curva de supervivencia tras la última inyección de busulfán mostró una mortalidad más temprana en los ratones tratados con 5 dosis de busulfán, llegando a una mortalidad del 100% tras cuatro semanas, frente a un 50 % de mortalidad con 4 dosis en ese tiempo (Fig. 30a). Esto indicaba que la dosis de 100 mg/kg podría ser insuficiente para producir un buen acondicionamiento del cerebro (Lampron, Lessard, & Rivest, 2012), y que la dosis de 125 mg/kg proporcionaría una mayor homogeneidad y eficiencia en la mieloablación, comparable a la de una dosis de irradiación de 10 Gy para la ablación total de la médula ósea (Jopling & Rosendaal, 2001; Wilkinson et al., 2013). Para investigar el potencial de esta terapia en el tratamiento de la encefalopatía mitocondrial asociada a la deficiencia en CoQ a través del modelo *Coq9^{R239X}*, se inyectaron mHSCs procedentes de ratones

Resultados

wild-type (*Coq9*^{+/+}) en la vena de la cola de ratones *Coq9*^{+/+} y *Coq9*^{R239X} de 4 semanas de edad tras la administración de una dosis de 125 mg/kg de busulfán, y se llevó a cabo un análisis de la sangre periférica a las 7 semanas tras el trasplante y un análisis en tejido a los 4 meses tras el trasplante. Los ratones *Coq9*^{R239X} trasplantados mostraron una recuperación de todos los componentes de la sangre a las 7 semanas del trasplante (Fig. 30, b-h; Tabla 4).

	Vehicle	Busulfan 4d (100 mg/kg)	Busulfan 5d (125 mg/kg)	Post mHSCs inoculation
WBC	4,50 ± 1,0	0,67 ± 0,29	0,50 ± 0,35	4,55 ± 0,21
RBC	10,36 ± 0,79	2,89 ± 1,39	1,95 ± 0,74	9,41 ± 0,21
HGB	16,13 ± 1,06	4,37 ± 2,29	2,78 ± 1,20	13,60 ± 0,00
HCT	46,27 ± 1,42	13,03 ± 6,54	8,32 ± 3,21	36,60 ± 0,57
PLT	657 ± 139,46	75 ± 39,05	32,20 ± 25,15	489 ± 82,02
LYM	4,30 ± 1,05	0,67 ± 0,29	0,50 ± 0,35	4,25 ± 0,21
NEU	0,17 ± 0,06	0 ± 0	0 ± 0	0,25 ± 0,07

Tabla 4. La administración de busulfán produce ablación de la médula ósea y permite una posterior repoblación de las mHSCs trasplantadas en los ratones *Coq9*^{R239X}. Valores correspondientes a los datos de la figura 17b-g. **WBC** = N° total de glóbulos blancos (10³/μl). **RBC** = N° total de glóbulos rojos (10⁶/ μl). **HGB** = Hemoglobina (g/dL). **HCT** = % Volumen de sangre ocupado por glóbulos rojos (hematocrito). **PLT** = N° total de plaquetas (10³/ μl). **LYM** = N° total de linfocitos (10³/ μl). **NEU** = N° total de neutrófilos (10³/ μl). (n = 3-5 para cada grupo).

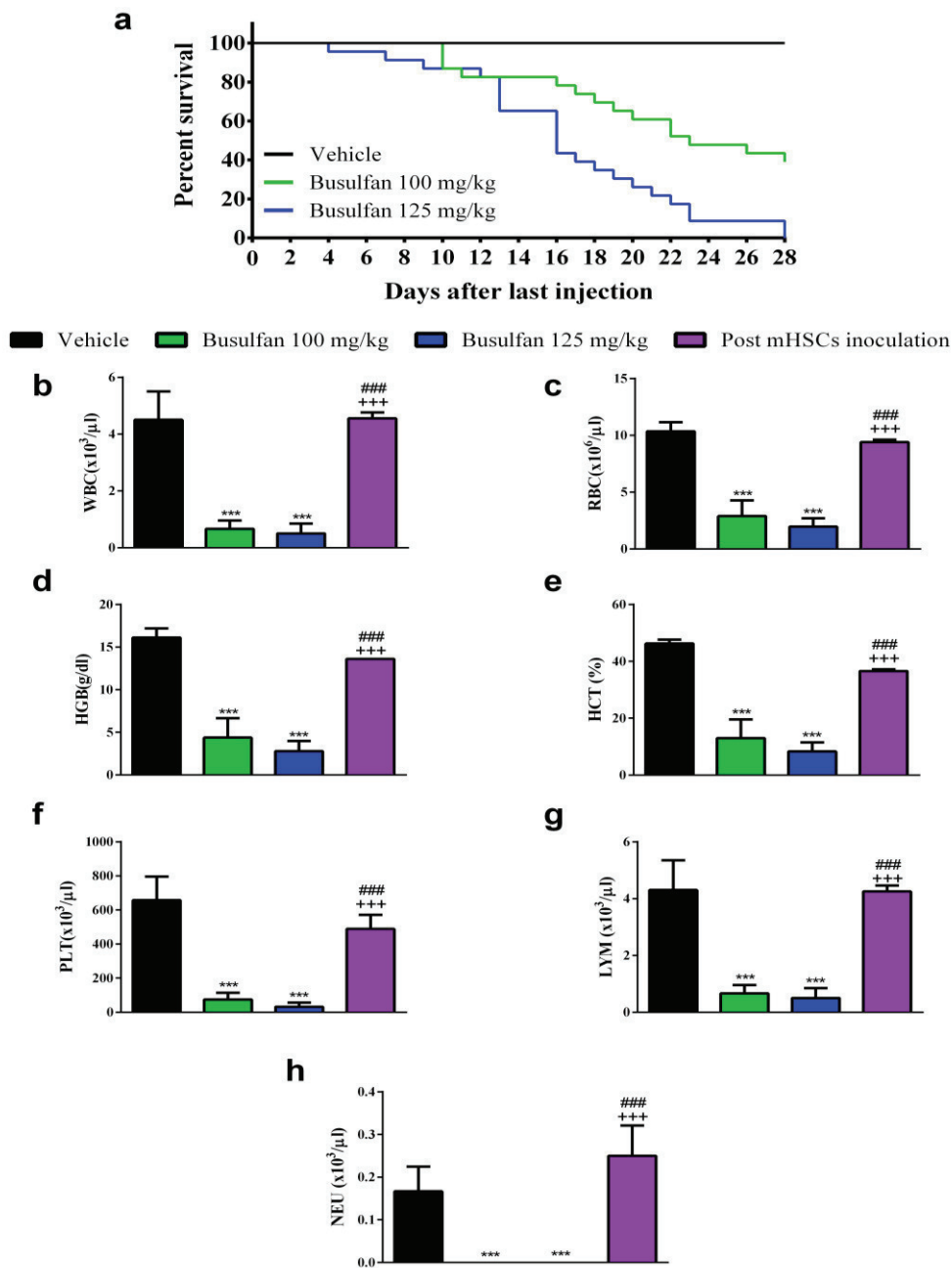


Figura 30. La administración de busulfán produce ablación de la médula ósea y permite una posterior repoblación de las mHSCs trasplantadas en los ratones *Coq9^{R239X}*. (a) Curva de supervivencia tras la administración de 4 (100 mg/kg) o 5 (125 mg/kg) dosis de busulfán o vehículo en ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{R239X}*. (Vehículo, $n = 11$; Busulfán 100 y 125 mg/kg, $n = 22$ para cada grupo). (b-h) Resultados del hemograma realizado a los 15 días de la administración de vehículo (en 5 dosis), o busulfán a 100 mg/kg

Resultados

o a 125 mg/kg en ratones *Coq9^{+/+}* y *Coq9^{R239X}*; y a las 7 semanas tras la inoculación de mHSCs en ratones *Coq9^{R239X}*; ($n = 3-5$ para cada grupo). (Ver equivalencias de los componentes sanguíneos en la Tabla 3). Los datos se expresan como la media aritmética \pm SD. *** $P < 0,001$, ratones tratados con vehículo versus ratones tratados con busulfán a 100 o 125 mg/kg; +++ $P < 0,001$, ratones tratados con busulfán a 100 mg/kg versus ratones post-inoculación de mHSCs; ### $P < 0,001$, ratones tratados con busulfán a 125 mg/kg versus ratones post-inoculación de mHSCs. (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey).

A continuación se procedió a analizar el grado de repoblación de las células donantes en los diferentes tejidos de los ratones receptores. Para ello se transdujeron mHSCs-*Coq9^{+/+}* con un vector reportero expresando eGFP, el vector SEWP, con el fin de facilitar su identificación. Los ratones acondicionados con busulfán a 125 mg/kg fueron inoculados vía intravenosa con mHSCs-*Coq9^{+/+}*/SEWP (84% eGFP+) y analizados a las 7 semanas (sangre periférica) y a los 4 meses (ganglios, bazo, timo, cerebro, riñón e hígado). El análisis en sangre periférica a las 7 semanas mostró niveles de repoblación muy altos (cercaos al 100%), tal como se refleja en el alto porcentaje de células eGFP+, cercano al porcentaje observado en las células en cultivo (Fig. 31, a y b). Además, las células trasplantadas fueron capaces de diferenciarse tanto hacia linaje linfóide (CD3 y B220), como mielóide (CD33 y CD11b) (Fig. 31c).

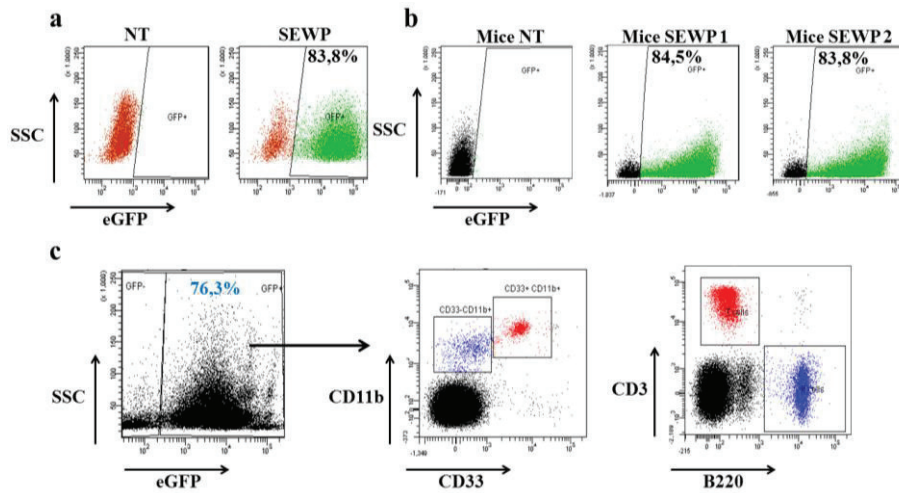


Figura 31. Repoblación de las células sanguíneas por parte de las mHSCs trasplantadas en los ratones *Coq9*^{R239X}. (a) Plots representativos de la expresión de eGFP en las células mHSCs no transducidas (NT) y transducidas (SEWP) en cultivo. (b) Plots representativos de la expresión de eGFP en sangre de ratones *Coq9*^{R239X} trasplantados con mHSCs no transducidas (izquierda) y mHSCs transducidas con SEWP (centro y derecha). (c) Plots representativos de los marcadores mieloides (CD33 y CD11b) y linfoides (CD3 para células T y B220 para células B), en la población GFP positiva seleccionada.

De acuerdo a la ventana de mortalidad del modelo de ratón *Coq9*^{R239X} (entre 3 y 7 meses de edad) y a lo descrito previamente en la literatura en relación al trasplante de mHSCs e injerto de dichas células en el cerebro en enfermedades que involucran el SNC (Biffi et al., 2006; Langford-Smith et al., 2012; Rocca et al., 2017), establecimos un punto de análisis del injerto de las mHSCs transducidas con SEWP en los tejidos a los 4 meses post-inoculación (5 meses de edad). Sin embargo, para este punto de tiempo todos los ratones *Coq9*^{R239X} trasplantados habían muerto, sugiriendo que la terapia celular, esto es, el trasplante de mHSCs sanas *wild-type*, no funciona en el modelo *Coq9*^{R239X}, y la posible necesidad de una sobreexpresión de la

proteína terapéutica a través de la terapia génica. Por tanto, el análisis de eGFP en los tejidos a los 4 meses post-trasplante se llevó a cabo únicamente en los ratones *Coq9*^{+/+} inoculados con las células transducidas con SEWP. Los resultados mostraron que las mHSCs transducidas con SEWP inoculadas eran capaces de colonizar tejidos propiamente hematopoyéticos, como los ganglios, el bazo o el timo, encontrándose células GFP+ en unos porcentajes relativamente altos (~50% de eGFP+ en los ganglios, 75% en bazo y 90% en timo) (Fig. 32, a-c). Más allá del injerto en estos tejidos, los tejidos no hematopoyéticos también mostraron infiltración de células derivadas de las mHSCs trasplantadas, alcanzándose alrededor de un 35% de células eGFP positivas en hígado, 10% en riñones y un 2,5% en cerebro (Fig. 32, d-f).

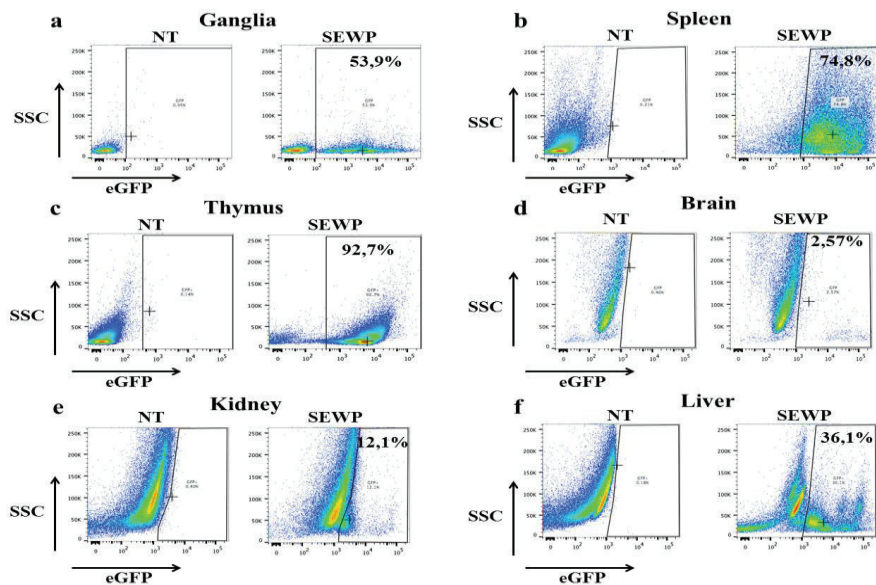


Figura 32. Colonización de los tejidos por las mHSCs trasplantadas en los ratones *Coq9*^{+/+} a los 4 meses tras el trasplante. Plots representativos de la expresión de eGFP en ganglios (a), bazo (b), timo (c), cerebro (d), riñón (e) e hígado (f) de los ratones *Coq9*^{+/+} inoculados con mHSCs no transducidas (izqda) y mHSCs transducidas con SEWP (dcha).

4.2.1.2.2 Ensayo piloto de terapia en ratones *Coq9*^{R239X}

Tras ese estudio preliminar con eGFP, se puso en marcha un estudio piloto de terapia celular-génica con mHSCs de ratones donantes *wild-type* transducidas con el vector SCoq9WP. Se analizó la expresión de *Coq9* a través del mRNA en las mHSCs transducidas en cultivo a los 7 días de la transducción, consiguiendo una sobreexpresión de ~14 veces sobre los valores de las células *wild-type* sin transducir o transducidas con SEWP (Fig. 33a). Curiosamente, pese a la baja sobreexpresión de *Coq9* en las células en cultivo, el análisis de la expresión del mensajero *Coq9* en sangre periférica total de los ratones *Coq9*^{R239X} reveló una sobreexpresión extremadamente elevada en los ratones trasplantados con las células mHSCs/SCoq9WP, alcanzando niveles ~1200 veces superior a los niveles de los ratones *Coq9*^{+/+}; mientras que los ratones *Coq9*^{R239X} trasplantados con mHSCs/SEWP mostraron una normalización en la expresión del mensajero *Coq9*, con un nivel comparable al de los ratones *Coq9*^{+/+}, a diferencia de los ratones *Coq9*^{R239X} control, que mostraron una reducción de la expresión de *Coq9* a nivel de mensajero de ~80% respecto a los *wild-type* (Fig. 33b). Sin embargo, a pesar de los buenos indicadores de mRNA en sangre a estadíos tempranos, los ratones *Coq9*^{R239X} tratados siguieron un perfil de pérdida de peso y síntomas de la patología similares a los no tratados, indicando ausencia de beneficios terapéuticos. Se procedió por tanto a adelantar el

sacrificio a los 4 meses de edad (3 meses post-trasplante) para determinar repoblación de las HSCs y potenciales mejoras parciales en los diferentes tejidos. Al contrario de lo observado en sangre a períodos tempranos, los niveles del producto final de la ruta en la que participa la proteína COQ9, el lípido CoQ₉, no sufrieron modificaciones significativas en la mayoría de los tejidos, aunque se observaba una leve tendencia al aumento en tejidos periféricos, como el hígado, el riñón, el corazón y el músculo esquelético, no detectada en el cerebro (Fig. 33c). Por tanto, continuaba acumulándose DMQ₉ y el ratio DMQ₉/CoQ₉ se mantuvo en niveles similares al obtenido en los ratones mutantes en todos los tejidos (Fig. 33d).

Todos estos datos indicaban que la estrategia *ex vivo* no había logrado los objetivos deseados, planteándonos la baja sobreexpresión conseguida inicialmente en las mHSCs y/o unos bajos niveles de repoblación en los tejidos a largo tiempo como algunas de las posibles causas del fracaso.

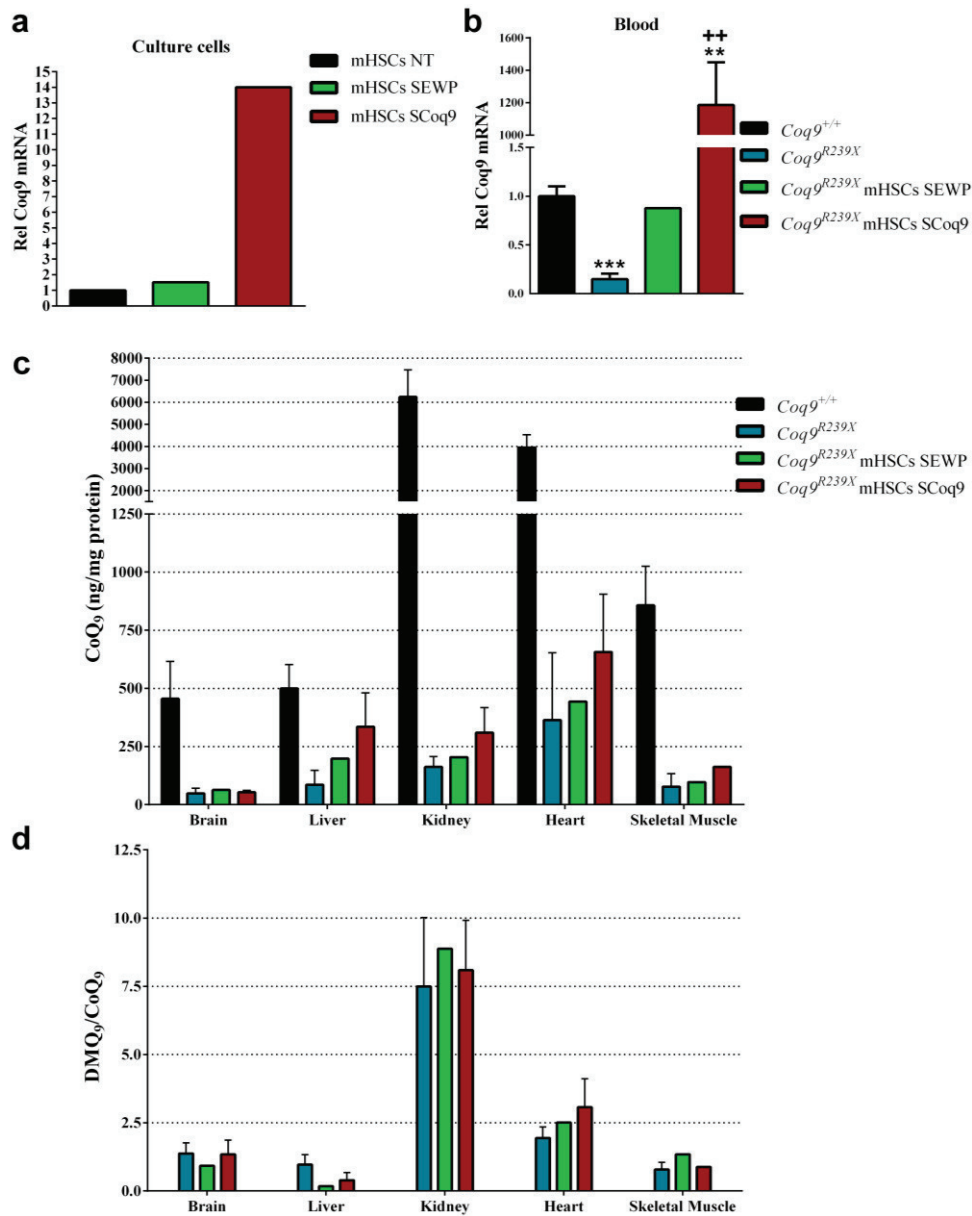


Figura 33. Ensayo piloto de estrategia de terapia celular-génica con el vector lentiviral terapéutico SCoq9WP. (a) Expresión del mRNA de *Coq9* en las mHSCs en cultivo transducidas con el vector SCoq9WP a los 7 días post-transducción ($n = 1$, para cada grupo experimental). (b) Expresión del mRNA de *Coq9* en la sangre de ratones *Coq9*^{R239X} inoculados con las mHSCs a las 5 semanas post-inoculación (*Coq9*^{+/+}, $n = 3$; *Coq9*^{R239X}, $n = 3$; *Coq9*^{R239X} mHSCs SEWP, $n = 1$; *Coq9*^{R239X} mHSCs SCoq9WP, $n = 2$). Niveles de CoQ₉ (c) y ratio DMQ₉/CoQ₉ (d) en diferentes tejidos a los 3 meses del trasplante, (*Coq9*^{+/+}, $n = 6$; *Coq9*^{R239X}, $n = 6$; *Coq9*^{R239X} mHSCs SEWP, $n = 1$; *Coq9*^{R239X} mHSCs SCoq9WP, $n = 3$ [excepto para músculo, $n = 1$]). (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey o t-test).

4.2.2 TERAPIA GÉNICA *IN VIVO*: ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE VECTORES ADENOASOCIADOS (AAV) EXPRESANDO Coq9

Paralelamente al estudio piloto de terapia con mHSCs transducidas con vectores lentivirales SCoq9WP, llevamos a cabo otro ensayo piloto de terapia génica *in vivo* mediante la inoculación directa de vectores adenoasociados (AAVs) por vía intravenosa. Para ello se obtuvieron AAVs de cadena simple y serotipo 9 portando el cDNA de Coq9 de ratón (ssAAV9-CAG-Coq9) gracias a la colaboración con el grupo de la doctora Gloria González Aseguinolaza. Para el ensayo se utilizaron 2 dosis de administración diferentes en los ratones *Coq9*^{R239X}: 3×10^{10} y 2×10^{11} pv/ratón. Al igual que en la estrategia *ex vivo*, la sangre de los diferentes ratones fue analizada a las 5 semanas, y los tejidos se analizaron a los 3 meses de la inoculación (Fig. 34). Al contrario que en el experimento *ex vivo*, no se observaron diferencias en la expresión de *Coq9* en sangre entre los ratones *Coq9*^{R239X} controles y los inoculados con las diferentes dosis de ssAAV9-CAG-Coq9, observándose niveles de entorno a un 20% respecto a los valores de los ratones *Coq9*^{+/+} (Fig. 34a). Sin embargo, los niveles de CoQ de los ratones *Coq9*^{R239X} inyectados con los vectores AAVs reflejaron un incremento en algunos tejidos periféricos, más leve en el hígado, pero muy marcado en músculo esquelético y corazón, viéndose una respuesta dosis-dependiente, en la que

Eliana Barriocanal Casado

se alcanzaron valores muy cercanos a los ratones *wild-type* en corazón y músculo con la dosis más alta (Fig. 34b). En concordancia con estos resultados, se observó una disminución en la acumulación de DMQ, llegando incluso a desaparecer en corazón y músculo esquelético a la dosis más alta, de manera que el ratio DMQ/CoQ fue similar al de los ratones *wild-type* en estos tejidos (Fig 34c). Sin embargo, la medida de CoQ₉ en el cerebro y riñón de los ratones inyectados siguió mostrando niveles similares a los ratones *Coq9^{R239X}* controles para ambas dosis del vector AAV (Fig. 34b), de manera que en estos tejidos no se producía ninguna corrección del déficit de CoQ y el ratio DMQ₉/CoQ₉ se mantuvo elevado (Fig. 34c).

Desafortunadamente, a pesar de las mejoras y/o correcciones de los niveles de CoQ₉ y DMQ₉ en el hígado, músculo y corazón de los ratones *Coq9^{R239X}* tras la administración de los vectores AAV9/Coq9, no se observaron mejoras en el estado físico de estos ratones y su supervivencia en el ensayo piloto mostró un perfil similar a los ratones no tratados. Estos datos sugieren un importante papel del cerebro y/o riñones en el desarrollo de la patología.

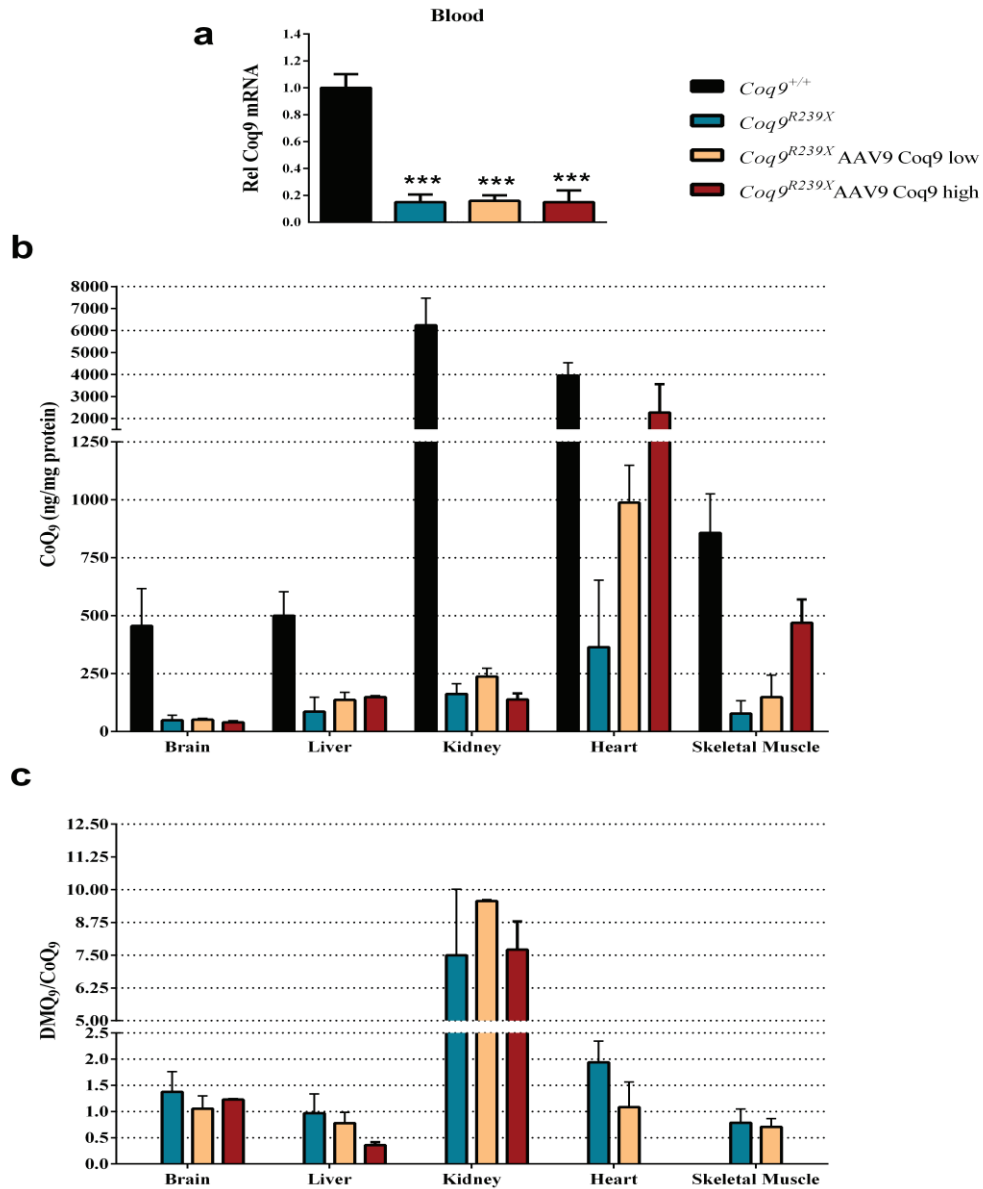


Figura 34. Ensayo piloto de estrategia de terapia génica con vectores adenoasociados ssAAV9-CAG-Coq9. (a) Expresión del mRNA de *Coq9* en la sangre de ratones $Coq9^{R239X}$ inyectados con vectores AAV9Coq9 a las 5 semanas de la inyección ($Coq9^{+/+}$, $n = 3$; $Coq9^{R239X}$, $n = 3$; $Coq9^{R239X}$ AAV9 Coq9, $n = 5$). Niveles de CoQ₉ (c) y ratio DMQ₉/CoQ₉ (d) en diferentes tejidos a los 3 meses de la inoculación, ($Coq9^{+/+}$, $n = 6$; $Coq9^{R239X}$, $n = 6$; $Coq9^{R239X}$ AAV9 Coq9 low, $n = 2$; $Coq9^{R239X}$ AAV9 Coq9 high, $n = 2$). (ANOVA de una vía con test post hoc de Tukey o t-test).

Eliana Barriocanal Casado

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 LA RAPAMICINA NO ES UNA TERAPIA VÁLIDA PARA TODAS LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Desde la publicación del estudio de Johnson y colaboradores en el año 2013 sobre los efectos terapéuticos de la rapamicina en el modelo de encefalopatía mitocondrial asociada a deficiencia en complejo I (*Ndufs4^{-/-}*) (S. C. Johnson et al., 2013), se han reportado varios trabajos afirmando que la inhibición de mTORC1 mediante la administración de rapamicina tiene efectos terapéuticos, con diferente intensidad, en varios modelos preclínicos de enfermedad mitocondrial con distintos defectos moleculares y fenotipos. Sin embargo, nuestro estudio demuestra que la inhibición de mTORC1 no produce ningún efecto terapéutico en un modelo de ratón de encefalopatía mitocondrial causada por deficiencia en CoQ. Por tanto, al contrario de lo que se podría suponer a partir de los trabajos publicados previamente, los resultados mostrados en esta tesis ponen de manifiesto que el tratamiento crónico con rapamicina no es una estrategia terapéutica válida para todos los casos de enfermedad mitocondrial, ni siquiera para los casos de encefalopatía mitocondrial donde el sistema nervioso central es la estructura más afectada.

En ese primer trabajo en ratones *Ndufs4^{-/-}*, Johnson y colaboradores mostraron que la administración intraperitoneal diaria de altas dosis de

Eliana Barriocanal Casado

rapamicina disminuía considerablemente la gliosis y los signos histopatológicos en el modelo de ratón de síndrome de Leigh causado por deficiencia en complejo I, produciendo un efecto muy considerable sobre la supervivencia (S. C. Johnson et al., 2013). Otros dos estudios posteriores confirmaban que la administración oral de diferentes dosis de rapamicina en la dieta (en un rango empezando por 42 y hasta 378 ppm) retrasaban el desarrollo de los síntomas neurológicos y aumentaban la supervivencia de los ratones *Ndufs4^{-/-}*, confirmando así que la esta ruta de administración no suponía una limitación (Felici et al., 2017; S. C. Johnson et al., 2015). Sin embargo, en ninguno de los estudios se corregía la disfunción mitocondrial y el mecanismo por el cual la rapamicina producía el efecto terapéutico no estaba claro. Por ello, estos estudios abrían una nueva perspectiva terapéutica para la rapamicina, propiciando el ensayo de esta terapia en otros modelos de enfermedad mitocondrial. Así, en un modelo de ratón de encefalopatía causada por depleción de DNA mitocondrial por deficiencia en la enzima timidina quinasa 2 (TK2), el modelo *Tk2^{H126N}*, la administración oral de rapamicina a bajas dosis inducía un leve aumento en la supervivencia sin producir mejoras en las características morfológicas de los ratones (Siegmond et al., 2017). En otros dos modelos de ratón con fenotipos menos graves, el tratamiento intraperitoneal con rapamicina a altas dosis también resultaba en beneficios terapéuticos: en uno de ellos, el modelo de miopatía

mitocondrial con deficiencia en la citocromo oxidasa (COX) por ablación específica del gen *Cox15* en músculo (modelo *Cox15^{sm/sm}*), la rapamicina mejoraba la actividad locomotora, corregía las características histopatológicas e incrementaba la actividad de COX en el músculo (Civiletto et al., 2018); en el otro modelo, un modelo de miopatía mitocondrial tardía por defectos en la helicasa *Twinkle* (modelo *Twnk^{dup}*), la rapamicina producía una disminución en la respuesta a estrés mitocondrial (UPRmt), revirtiendo la progresión de la miopatía (Khan et al., 2017). Contrario a estos resultados, la administración oral de rapamicina tanto a dosis bajas (28 ppm) como altas (225 ppm) no produjo ningún beneficio terapéutico en los ratones *Coq9^{R239X}*. De hecho, el grupo de animales tratado con la dosis alta de rapamicina experimentó una agravación de las lesiones cerebrales resultando en un descenso, aunque leve, de la supervivencia. Esto podría atribuirse a los efectos secundarios reportados para esta droga, como pueden ser la trombocitopenia e hiperlipidemia, alteraciones en la cicatrización de heridas, nefrotoxicidad o alteraciones en la sensibilidad a la insulina (Li, Kim, & Blenis, 2014). En este sentido, es importante destacar que la inhibición de mTORC1 fue claramente detectada en los tejidos únicamente a la dosis alta de rapamicina, aunque la dosis baja produjo una leve inhibición en corazón e hígado. Esto se correlaciona con el hecho de que la rapamicina produce mejoras morfológicas y fenotípicas con aumento de supervivencia en el

Eliaana Barriocanal Casado

modelo *Ndufs4*^{-/-} de una manera dosis-dependiente (Felici et al., 2017; S. C. Johnson et al., 2015; S. C. Johnson et al., 2013). De hecho, nuestro análisis transcriptómico en el mesencéfalo reveló diferencias dosis-dependientes en los DEGs, lo que podría explicarse por efectos sistémicos de la administración de rapamicina y efectos específicos relacionados con la inhibición directa de mTORC1 en el cerebro.

Las diferencias en los efectos terapéuticos de la rapamicina entre los diferentes modelos de enfermedad mitocondrial deberían explicarse por mecanismos específicos que ocurren en cada modelo. En primer lugar, en los tejidos sintomáticos de los ratones *Ndufs4*^{-/-} y *Twnk*^{dup} el ratio p-S6/S6, usado como marcador de la actividad de mTORC1, está aumentado en relación a sus homólogos *wild-type*, y la rapamicina redujo esa sobre-activación (S. C. Johnson et al., 2013; Khan et al., 2017). En los ratones *Coq9*^{R239X} la rapamicina también redujo el ratio p-S6/S6 en cerebro a la dosis alta, pero en este caso los ratones mutantes y *wild-type* no tratados mostraron ratios p-S6/S6 similares. De igual forma, en los ratones *Tk2*^{H126N} y *Cox15*^{sm/sm} tampoco se observó sobre-activación de mTORC1 y, sin embargo, en estos modelos la rapamicina mostró efectos terapéuticos relevantes (Civiletto et al., 2018; Siegmund et al., 2017).

La rapamicina, a través de la inhibición de mTORC1, fue capaz de disminuir la microgliosis y reducir la expresión de algunos genes

inflamatorios relacionados con la microglía en los ratones *Ndufs4^{-/-}* (S. C. Johnson et al., 2013; Yu, Datta, McMackin, & Cortopassi, 2017). En cambio, los ratones *Coq9^{R239X}* no podían verse beneficiados de este efecto, ya que no detectamos signos claros de microgliosis de forma general en este modelo a través de la inmunohistoquímica. Además, los genes inflamatorios diferencialmente expresados observados en análisis transcriptómicos de ratones *Coq9^{R239X}* corresponden a la proliferación de astrocitos y no de microglía (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019). Por último, algunos genes inflamatorios clave regulados negativamente tras el tratamiento con rapamicina en los ratones *Ndufs4^{-/-}* (*Tlr2*, *Cxcl10*, *Ccl5* and *Aif1*) (Yu et al., 2017) no están recogidos en nuestro análisis transcriptómico (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-7794/>).

Otro de los mecanismos terapéuticos potenciales atribuidos a la rapamicina en las enfermedades mitocondriales es la activación de la autofagia y la biogénesis lisosomal (Civiletto et al., 2018; Laplante & Sabatini, 2012). Nuestro análisis transcriptómico no reveló ningún signo de inducción de biogénesis lisosomal y los marcadores de autofagia evaluados tampoco sugerían una inducción general de la autofagia. Esta ausencia de señal de actividad autofágica podría deberse al hecho de que la deficiencia en CoQ induce una respuesta autofágica temprana, tal como sugieren nuestros datos en cerebro de ratones *Coq9^{R239X}* a los 2 meses de edad y como se ha

Eliana Barriocanal Casado

reportado previamente *in vitro* (Rodríguez-Hernández et al., 2009). Esta respuesta temprana podría verse interrumpida con el tiempo por un deterioro de los lisosomas inducido por el daño oxidativo (Demers-Lamarche et al., 2016). De hecho, se ha comprobado ampliamente en sistemas *in vitro* e *in vivo* que la deficiencia en CoQ induce estrés oxidativo (Duberley et al., 2013; Quinzii et al., 2013; Quinzii et al., 2010), y, más concretamente, el puente y diencéfalo de los ratones *Coq9*^{R239X} han mostrado un incremento en la señal para los marcadores de estrés oxidativo (García-Corzo et al., 2013; García-Corzo et al., 2014; Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019).

Un tercer mecanismo terapéutico propuesto para la rapamicina es la inhibición de la respuesta mitocondrial a estrés, lo cual incluye la represión de la respuesta mitocondrial a proteínas desplegadas (UPRmt, del inglés *mitochondrial unfolded protein response*). Sin embargo, el efecto deletéreo que produce la inducción de esta respuesta solo se ha identificado en el modelo *Twnk*^{dup} de miopatía mitocondrial (Khan et al., 2014; Khan et al., 2017), y los niveles de dos proteínas involucradas en la UPRmt, las proteínas HSPA9 (o GRP75) y la subunidad proteolítica dependiente de ATP de la proteasa Clp (CLPP), no están alterados en otro modelo de deficiencia en CoQ causada por una mutación diferente en el gen *Coq9* (Rodríguez-Hidalgo et al., 2018).

El último mecanismo terapéutico de la rapamicina que se ha planteado es un *bypass* parcial del defecto en el sistema OXPHOS aprovechando reservas de energía alternativas como los aminoácidos y los lípidos (Siegmund et al., 2017). Este mecanismo podría ser relevante terapéuticamente en los casos de deficiencias en complejo I o complejo II. Sin embargo, el efecto podría tener ciertas limitaciones en el caso de las deficiencias en CoQ, ya que muchas rutas del metabolismo energético, esto es, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de lípidos, metabolismo del sulfuro y metabolismo de las pirimidinas, convergen en la utilización de CoQ para introducir los electrones en la cadena respiratoria mitocondrial (Lemieux, Blier, & Gnaiger, 2017; Luna-Sánchez et al., 2017). No obstante, nosotros observamos pequeños cambios en los niveles de metabolitos relacionados con el metabolismo de aminoácidos, nucleótidos y, algo más evidentes, en el metabolismo de lípidos en el hígado, con un efecto limitado en el cerebro, tal como se reportó en el modelo $Tk2^{H126N}$ (Siegmund et al., 2017). Sin embargo, estos cambios en el metabolismo lipídico estaban relacionados con el metabolismo de eicosanoides, más que con la β -oxidación y el metabolismo energético.

Mientras nuestros resultados sugieren que la administración de rapamicina no es válida como opción terapéutica en la deficiencia primaria en CoQ, un estudio reciente en el modelo de ratón de deficiencia en CoQ causada por una mutación puntual en el gen $Pdss2$, el modelo $Pdss2^{kd/kd}$, mostró que la

Eliana Barriocanal Casado

administración oral de altas dosis de rapamicina (225 ppm) reducía la albuminuria en este modelo de ratón con síndrome nefrótico (Peng et al., 2015). Sin embargo, no se analizó la supervivencia ni se mostró la estructura morfológica del glomérulo renal, de manera que esa reducción de los niveles de albúmina en la orina podría ser simplemente resultado de una perturbación en la síntesis de proteínas por una reducción de la fosforilación de 4E-BP1 y S6K1 causada por la inhibición de mTORC1 (Laplante & Sabatini, 2012). Además, es necesario tener en cuenta que la respuesta a la administración de rapamicina puede ser diferente entre ambos modelos de deficiencia en CoQ, $Pdss2^{kd/kd}$ y $Coq9^{R239X}$, por dos diferencias importantes entre ellos: 1) los ratones $Pdss2^{kd/kd}$ tienen una deficiencia severa en CoQ, al igual que los ratones $Coq9^{R239X}$, pero estos últimos además acumulan un intermediario tóxico, la demetoxiubiquinona (DMQ) (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019), la cual se sigue acumulando tras el tratamiento con rapamicina y produce una competición no funcional con la CoQ (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019; Padilla et al., 2004; Yang et al., 2011); y 2) mientras los ratones $Pdss2^{kd/kd}$ desarrollan síndrome nefrótico y mueren entre los 5 y los 11 meses de edad, los ratones $Coq9^{R239X}$ desarrollan una encefalopatía mitocondrial, con una potencial contribución de interacciones endocrinas sobre las características patológicas de la enfermedad (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019; Kleiner et al.,

2018), y mueren entre los 3 y los 7 meses de edad (García-Corzo et al., 2013; Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019).

En conclusión, nuestro estudio sugiere que el uso de la rapamicina en pacientes con enfermedad mitocondrial debe ser evaluado para cada caso particular. El fracaso de la terapia con rapamicina en el modelo de ratón *Coq9^{R239X}* puede deberse a diversos factores, como: 1) la ausencia de neuroinflamación asociada a la microglía en este modelo encefalopático; 2) el daño en los lisosomas, que puede impedir la inducción de un flujo de autofagia; 3) la ausencia de una respuesta mitocondrial a estrés en ratones con deficiencia en CoQ; o 4) la necesidad de una función residual de la CoQ para promover el aporte de electrones dentro de la cadena respiratoria mitocondrial a partir de diferentes recursos metabólicos. Por tanto, previo a la traslación de esta terapia a la clínica se requieren estudios adicionales y se deben considerar las particularidades de cada enfermedad mitocondrial. Además, el desarrollo de nuevas terapias racionales debe proporcionar los mejores resultados terapéuticos con los mínimos efectos secundarios, como ya ha sido demostrado a nivel preclínico en algunos de los modelos en los que se ha probado la rapamicina, como la terapia con dNTPs o nucleósidos en la deficiencia en Tk2 (Garone et al., 2014; Lopez-Gomez et al., 2017), la administración de AICAR o sobreexpresión de OPA1 en la deficiencia en COX (Civiletto et al., 2015; Viscomi et al., 2011), o la terapia con el ácido β -

Eliana Barriocanal Casado

resorcílico en los casos de deficiencia en CoQ debida a defectos en los genes de biosíntesis de CoQ *Coq7* o *Coq9* (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019; Wang et al., 2015).

5.2 TERAPIA CELULAR-GÉNICA: LA NECESIDAD DE SUPERAR ALGUNAS LIMITACIONES

En la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de las enfermedades mitocondriales ha surgido la terapia génica como una potencial vía terapéutica, al igual que ocurre con otras enfermedades monogénicas. En particular, las encefalopatías mitocondriales pueden estar causadas por mutaciones en genes del DNA nuclear que codifican proteínas importadas a lamitocondria, no existiendo tratamiento para la mayoría de estas enfermedades más allá de los cuidados paliativos para aliviar ciertos síntomas. En este sentido, muchas estrategias de terapia génica para enfermedades que involucran el SNC están dirigidas a restaurar la función deficiente a través de la transferencia directa del gen que codifica la proteína *wild-type* en el SNC (Jakobsson & Lundberg, 2006; Meneghini et al., 2016), o mediante el uso de HSCs como vehículo para proporcionar la proteína o el producto final en el tejido a través de la renovación de la población de células mieloides residente en el SNC (Bowers, Breakefield, & Sena-Esteves, 2011; Naldini, 2019). Ambas estrategias requieren el desarrollo de vectores eficientes y seguros capaces de proporcionar el gen terapéutico al SNC y/o a

las HSCs. Los vectores lentivirales se han usado con éxito en ambas estrategias en modelos preclínicos y en estudios clínicos (Naldini, 2015).

Nosotros hemos desarrollado un vector lentiviral (CCoq9WP) capaz de sobreexpresar el mRNA de *Coq9* y la proteína COQ9 normalizando así la ruta biosintética de CoQ y la función mitocondrial en las células derivadas de los ratones mutantes. Las capacidades del nuevo vector lentiviral se probaron en MEFs y mHSCs procedentes de ratones *Coq9^{R239X}*, nuestro modelo de ratón con encefalopatía mitocondrial. Las características patológicas que manifiesta este modelo, como degeneración espongiiforme, astrogliosis reactiva severa en puente y diencefalo y muerte temprana, son consecuencia de un daño en la bioenergética mitocondrial del cerebro debido a una deficiencia severa en CoQ, la cual está causada a su vez por una mutación en el gen *Coq9* (García-Corzo et al., 2013; Luna-Sánchez et al., 2015), y ha sido reportado también en pacientes con deficiencia primaria en CoQ₁₀ (Danhauser et al., 2016; Duncan et al., 2009; Rahman, Hargreaves, Clayton, & Heales, 2001). La sobreexpresión de *Coq9* en los MEFs y las mHSCs fue bien tolerada por ambos tipos celulares e incluso resultó en una mejora de las capacidades de crecimiento en los MEFs, lo cual podría deberse a una mejora en la función mitocondrial, la biosíntesis de pirimidinas o el metabolismo del sulfuro de hidrógeno, así como a una reducción del estrés oxidativo y la apoptosis (Duberley et al., 2013; López et al., 2010; López-Martín et al.,

Eliana Barriocanal Casado

2007; Quinzii et al., 2017; Quinzii et al., 2010; Quinzii et al., 2008). En fibroblastos de piel de un paciente con mutación en el gen *COQ9*, la transducción con lentivirus portadores del cDNA de *Coq9* también consiguió sobreexpresar la proteína COQ9 por encima de los niveles de los controles (Danhauser et al., 2016). Trabajos previos indicaban que COQ9 es necesaria para la estabilidad y funcionalidad de la proteína COQ7, una enzima catalítica de ruta de biosíntesis de CoQ (Hsieh et al., 2007; A. Johnson et al., 2005; Luna-Sánchez et al., 2015). Nuestros resultados aportaron una confirmación más de la interacción COQ7-COQ9, ya que la sobreexpresión de COQ9 en las células *Coq9^{R239X}* indujo un incremento en los niveles de COQ7. Resultados similares se obtuvieron en los fibroblastos del paciente con mutación en *COQ9* (Danhauser et al., 2016). La consecuencia directa del incremento en COQ7 en las células *Coq9^{R239X}* transducidas con el vector lentiviral CCoq9WP fue la total desaparición de la DMQ₉, el sustrato de la reacción catalizada por dicha enzima. Sin embargo, pese a que los niveles de las proteínas COQ9 y COQ7 en las células transducidas fueron superiores a los de sus correspondientes células control (entre 10 y 30 veces y 1 y 5 veces superior, respectivamente), los niveles del lípido CoQ₉, el producto final de la ruta, se incrementaron únicamente hasta ~1,5 veces sobre los niveles de las células *wild-type*. La sobreexpresión de *COQ8 (ADCK3)* en estudios con levaduras produjo resultados similares, alcanzándose un incremento en los

niveles de CoQ de 2,4 veces por encima de los niveles *wild-type* (Barros et al., 2005; Gomes, Tahara, Busso, Kowaltowski, & Barros, 2013). Estos resultados reflejan la compleja regulación de la ruta de biosíntesis de CoQ, la cual involucra al menos 13 proteínas diferentes, algunas de las cuales se organizan en un complejo multiproteico que permite la canalización de intermediarios lábiles o reactivos, aumenta la eficiencia catalítica y supone un mecanismo de regulación coordinada de los componentes de dicho complejo (González-Mariscal et al., 2014; Luna-Sánchez et al., 2015; Stefely & Pagliarini, 2017; Tran & Clarke, 2007).

La capacidad del vector CCoq9WP para sobreexpresar la proteína COQ9 en MEFs y mHSCs hasta 30 veces por encima de los niveles de los *wild-type* es un resultado importante para futuras aplicaciones. Nuestros resultados ofrecen la posibilidad de usar los LVs como herramienta para las estrategias de terapia génica tanto *in vivo* como *ex vivo* en el tratamiento de las deficiencias primarias en CoQ. Se ha demostrado que la inoculación directa de los LVs (terapia génica *in vivo*) es segura y eficiente para el tratamiento de diversas enfermedades en modelos animales (Delgado et al., 2008; Geraerts et al., 2006; Meneghini et al., 2016; Wong et al., 2014) y estudios clínicos (Palfi et al., 2014). Sin embargo, nosotros apostamos en esta Tesis por la estrategia *ex vivo*, mediante el trasplante autólogo de HSCs transducidas con LVs CCoq9WP. La idea es que estas células migren a los distintos tejidos,

Eliana Barriocanal Casado

incluyendo el SNC, donde se diferencien a macrófagos y microglía y sean capaces de proporcionar el producto terapéutico a las células residentes del tejido produciendo una corrección cruzada. Esta estrategia ha sido probada también de forma eficiente y segura en algunos modelos animales de leucodistrofias (Biffi et al., 2006; Biffi et al., 2004) y MNGIE (encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial), si bien en este último caso el objetivo primario era aumentar la expresión de la timidina fosforilasa (TP) en células circulantes, aunque de forma paralela se detectó un aumento de actividad TP en ciertos tejidos, especialmente en intestino delgado y músculo esquelético, y mínimamente en cerebro (Torres-Torronteras et al., 2016; Torres-Torronteras et al., 2011; Yadak et al., 2018). Además, los resultados preclínicos positivos de esta estrategia en las leucodistrofias la han llevado a su uso en ensayos clínicos, donde se han obtenido resultados muy esperanzadores. De este modo, se ha demostrado la capacidad de esta estrategia para curar pacientes con MLD, una patología hasta entonces incurable, con desarrollo de tetraplejia, retraso mental y con una esperanza de vida inferior a los 10 años (Biffi et al., 2013; Naldini, 2015, 2019). En este sentido, nos planteamos la hipótesis de que el trasplante de HSCs expresando altos niveles de COQ9 corregida podría ser también una alternativa terapéutica para la encefalopatía mitocondrial causada por la existencia de una proteína COQ9 truncada.

Los vectores lentivirales desarrollados en esta tesis fueron capaces de sobreexpresar el mRNA de *Coq9* y la proteína COQ9 en las mHSCs, dando lugar a un aumento de lípido CoQ₉ y de COQ7, que se incrementaba con el tiempo en cultivo. Estas diferencias podrían asociarse a un incremento de la masa y/o función mitocondrial y a un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno durante la diferenciación celular (Cho et al., 2006; O'Brien, Keeney, & Bennett, 2015; Owusu-Ansah & Banerjee, 2009; Romero-Moya et al., 2013; Tormos et al., 2011). En cualquier caso, pensamos que esto podría tener una implicación positiva para el uso de estas células en el trasplante *in vivo*, dado que serían las células diferenciadas a partir de las mHSCs las que repoblarían los tejidos y proporcionarían los productos terapéuticos para la cros-corrección.

Todos los datos observados en nuestros experimentos *in vitro* indicaban por tanto que los vectores CCoq9WP eran una buena herramienta para intentar el abordaje terapéutico de los ratones *Coq9*^{R239X} mediante trasplante de mHSCs transducidas.

En este tipo de estrategias resulta fundamental establecer un régimen de mieloablación adecuado capaz de producir una depleción de células hematopoyéticas en la médula ósea y de la microglía endógena que permita un reemplazo relativamente rápido de esa microglía residente del SNC por las células donantes. Muchos estudios en ratones utilizan un sistema de

Eliana Barriocanal Casado

mieloablación basado en la irradiación corporal del animal completo. Sin embargo, en la clínica es más común el uso de quimioterapia a través de la administración de drogas como el busulfán, y se ha comprobado además que este sistema es más eficiente a la hora de conseguir una transmigración e injerto de las células derivadas de las HSCs donantes en el cerebro en comparación con la irradiación, tanto a corto como a largo plazo tras el trasplante (Capotondo et al., 2012; Wilkinson et al., 2013). En esta Tesis utilizamos mHSCs transducidas con SEWP para demostrar que una dosis de 125 mg/kg de busulfán era óptima para conseguir repoblación en varios tejidos a 4 meses, incluyendo el SNC, aunque sería necesario analizar otros puntos de tiempo para determinar la estabilidad y eficiencia del injerto a lo largo del tiempo, tanto a tiempos más cortos tras el trasplante, como a largo plazo. De hecho, los ratones *Coq9^{R239X}* trasplantados con mHSCs transducidas con SEWP no superaron ese punto de análisis, esto es, 5 meses de edad. Esto podría indicar que la terapia celular a través de un trasplante alogénico con células procedentes de individuos sanos compatibles no funcionaría en la encefalopatía mitocondrial asociada a la deficiencia en CoQ, a diferencia de otras enfermedades mitocondriales como la ataxia de Friedreich, donde se ha visto a nivel preclínico que esta estrategia mejora el fenotipo de los ratones mutantes (Kemp et al., 2018; Rocca et al., 2017), o la enfermedad de MNGIE, donde algunos pacientes ya se han beneficiado de

esta terapia AHSCT (del inglés “*allogeneic hematopoietic stem cell transplant*”) (Halter et al., 2015). El fracaso o escaso beneficio de este tipo de terapias es algo común en las enfermedades que involucran el SNC y tienen un desarrollo temprano y/o una progresión rápida de los síntomas neurológicos o cuando se trata de pacientes ya sintomáticos, como se ha demostrado en algunas leucodistrofias y otras enfermedades lisosomales (Biffi et al., 2004; Krivit, Aubourg, Shapiro, & Peters, 1999; Lau et al., 2010; Peters, Steward, Program, Registry, & Working Party on Inborn Errors, 2003). Sin embargo, el trasplante de HSCs sobreexpresando el gen terapéutico ha cosechado éxitos clínicos, allí donde la terapia AHSCT no ha tenido ningún éxito.

Por tanto, procedimos a realizar un estudio piloto trasplantando mHSCs transducidas con SCoq9WP y utilizando 125 mg/kg de busulfán como régimen mieloablativo. Lamentablemente, no se consiguió una sobreexpresión eficiente de *Coq9* en las mHSCs, pero sí pudo observarse un incremento claro y elevado de los niveles de mRNA en sangre periférica a las 5 semanas del trasplante. Estos datos nos condujeron a pensar inicialmente en un claro éxito del experimento. Sin embargo, no fueron corroborados a etapas finales, ya que, aunque sí se observó una leve tendencia al aumento de CoQ en tejidos periféricos, no se vio ningún efecto sobre los niveles de lípido en el cerebro a los 3 meses del trasplante. A pesar de que a lo largo del tiempo, en

Eliana Barriocanal Casado

consonancia con la diferenciación y expansión de las mHSCs y acorde a los resultados publicados en otros trabajos (Biffi et al., 2006; Biffi et al., 2004; Torres-Torronteras et al., 2011), cabría esperar una mayor expresión de la proteína terapéutica y una corrección en los tejidos, los ratones *Coq9*^{R239X} trasplantados con las células mHSCs/Coq9 murieron en la ventana de edad de los ratones mutantes. Estos datos podrían indicar que las mHSCs/SCoq9WP habían sido incapaces de repoblar adecuadamente la médula y los tejidos diana como el SNC, barajando la posibilidad de que las mHSCs/SCoq9WP sufrieran diferenciación por el proceso de transducción y/o sobreexpresión de *Coq9*, reduciendo su capacidad de repoblación a largo tiempo. Sin embargo, nuestro estudio *in vitro*, no mostró diferencias en cuanto a diferenciación en las células transducidas respecto a las no transducidas.

Otra posibilidad es que no se consiguiera una suficiente sobreexpresión inicial de la proteína COQ9. Nuestro estudio *in vitro* mostró que unos niveles de sobreexpresión del mRNA de *Coq9* de entre 100 y 700 veces podrían correlacionarse con unos niveles de proteína COQ9 entre 10 y 30 veces sobre los niveles de los ratones *wild-type* (y 1-5 para COQ7, la enzima catalítica). Por tanto, aunque sería necesario un análisis molecular para determinar exactamente los niveles de las proteínas conseguidos *in vivo*, es muy probable que dichos niveles fueran irrelevantes y/o insuficientes para producir una corrección cruzada. De hecho, estudios preclínicos han

demostrado claramente que la eficiencia de la terapia celular-génica es muy dependiente de los niveles de sobreexpresión de la enzima o proteína terapéutica en algunas enfermedades (Biffi et al., 2004; Visigalli et al., 2010), e incluso se han visto correlaciones dosis-efecto en varios modelos animales, donde cuanto mayor es la producción de enzima por las células hematopoyéticas y/o en los tejidos de los animales de trasplantados, mayor es el beneficio ejercido en los lugares clave de la enfermedad, siempre y cuando no existan problemas de toxicidad por exceso de la proteína en cuestión (Biffi, 2017; Biffi et al., 2004; Gentner et al., 2010; Visigalli et al., 2010). Por tanto, una consecución de mayores niveles de sobreexpresión iniciales en las mHSCs trasplantadas podría ayudar a superar este problema.

Otra posible causa del fracaso de la terapia podría ser una insuficiente llegada de células donantes corregidas sobreexpresando *Coq9* a los tejidos y al SNC en la ventana terapéutica de nuestro modelo de ratón. Los ratones *Coq9*^{R239X} presentan un fenotipo más severo, con una mortalidad temprana entre 3 y 7 meses por el desarrollo de una encefalopatía severa (García-Corzo et al., 2013), que otros modelos donde sí ha funcionado la terapia con mHSCs transducidas con LVs, como los ratones *Arsa*^{-/-} con leucodistrofia metacromática, caracterizados por una progresión lenta de desórdenes del SNC y SNP a partir de los 5-6 meses de edad (Hess et al., 1996), o los ratones MPS IIIA con mucopolisacaridosis IIIA, que mueren entre los 10 y

Eliana Barriocanal Casado

los 13 meses de edad (Bhaumik et al., 1999; Langford-Smith et al., 2012); de manera que la ventana de actuación en cuanto al tratamiento de la enfermedad es mucho más corta. Para intentar superar esta barrera, se podría combinar la administración de mHSCs por vía intravenosa e intracerebroventricular como se ha demostrado previamente (Capotondo et al., 2017); intentar adelantar el tiempo de trasplante; intentar aumentar la ventana terapéutica a través de la administración de ácido β -resorcílico (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019); y/o inocular mezclas de mHSCs/SCoq9WP que contengan diferentes subpoblaciones: unas más “*stem*”, repobladoras a tiempos largos (*long-term*, duran toda la vida del ratón), y otras algo más diferenciadas hacia el linaje mielóide, con un tiempo de repoblación inferior (*short-term*).

Por último, otro posible problema de esta terapia en nuestro modelo de ratón podría ser la transferencia de proteínas en el caso de proteínas mitocondriales. La transferencia de proteínas lisosomales ha sido reportada en varios estudios *in vitro* e *in vivo* (Biffi et al., 2006; Biffi et al., 2004; Fratantoni, Hall, & Neufeld, 1968; Hasilik, Klein, Waheed, Strecker, & von Figura, 1980), pero no existen evidencias sobre la transferencia de proteínas mitocondriales. No obstante, en nuestro caso, cabe la posibilidad de que se pudiera transferir también el lípido CoQ₉ de forma más eficiente, lográndose igualmente la corrección de las células deficientes en CoQ. Además, la

caracterización previa de otro modelo de ratón con una deficiencia más leve en CoQ, el modelo *Coq9^{Q95X}*, sugiere que la consecución de unos niveles de CoQ en torno al 50% en las células del cerebro (respecto a los valores de los ratones *wild-type*) podría ser suficiente para corregir el fenotipo encefalopático (Luna-Sánchez et al., 2015).

Por tanto, ensayos futuros tendrán que ir encaminados a determinar en qué medida la ausencia de efecto terapéutico es debido a: 1) la ausencia de repoblación de las HSCs, 2) la baja expresión de proteína, 3) la limitada ventana terapéutica del modelo, y/o 4) la ausencia de transferencia de proteína mitocondrial y/o lípido para lograr la *cross-corrección*. De esta manera se determinará el potencial de esta estrategia terapéutica en los ratones *Coq9^{R239X}*.

5.3 TERAPIA GÉNICA CON VECTORES ADENOASOCIADOS

AAV9

Una estrategia de terapia génica que podría evitar las limitaciones de la terapia celular-génica mHSCs/Coq9 es la terapia basada en vectores adenoasociados. Muchos estudios preclínicos están apostando en los últimos años por esta terapia para tratar diferentes enfermedades gracias a su perfil de seguridad, el mantenimiento de la expresión durante períodos de tiempo relativamente largos y su versatilidad al disponer de serotipos con tropismos

Eliana Barriocanal Casado

diferentes (Bottani et al., 2014; Di Meo et al., 2012; Di Meo, Marchet, Lamperti, Zeviani, & Viscomi, 2017; Flierl et al., 2005; Torres-Torronteras et al., 2018; Torres-Torronteras et al., 2014).

Los AAV9 son vectores con tropismo amplio, lo cual permite la expresión en varios tejidos haciendo que sea un buen candidato para el uso de la terapia génica en trastornos multisistémicos. La administración sistémica por vía intravenosa de vectores adenoasociados AAV9-Coq9 produjo una normalización dosis-dependiente de los niveles de CoQ y DMQ en corazón y músculo esquelético de los ratones *Coq9^{R239X}*, así como una notable mejora en los niveles de dichos lípidos en hígado; pero no se detectaron efectos sobre los riñones y el cerebro. A pesar del restablecimiento de los niveles de ambos lípidos a niveles muy próximos a los de los ratones *wild-type* en estos tejidos periféricos tras la dosis alta, no se observaron diferencias a simple vista en el estado físico de estos ratones respecto a los ratones mutantes sin tratar, y tampoco se vieron efectos sobre la supervivencia. Estos resultados sugerían una participación importante del cerebro y/o los riñones en el desarrollo de la patología. Resultados similares se obtuvieron en el modelo *Ndufs4^{-/-}*, aunque no mostraron resultados en riñón (Di Meo et al., 2017). Además, la corrección del defecto molecular únicamente en el cerebro de los ratones *Ndufs4^{-/-}* tampoco conseguía aumentar la supervivencia (Di Meo et al., 2017). Recientemente, nuestro grupo ha publicado un trabajo donde los

ratones *Coq9^{R239X}* tratados con ácido β -resorcílico experimentaron una sorprendente mejora fenotípica y aumento de la supervivencia asociados a un descenso de la acumulación de DMQ y, por consiguiente, del ratio DMQ/CoQ en los tejidos periféricos (riñón, hígado, corazón y músculo esquelético). Sin embargo, no se observó efecto sobre la bioenergética mitocondrial en el cerebro, el cual sigue mostrando los niveles de CoQ y DMQ de los ratones mutantes (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2019). Estos resultados sugieren la existencia de una comunicación tejido-cerebro, de manera que la mejora en estos tejidos periféricos se traduce de alguna manera en la inducción de una mejora morfológica del cerebro, corrigiendo el fenotipo encefalopático del ratón. Teniendo en cuenta que la administración de AAV9/Coq9 consiguió corregir o mejorar los niveles de DMQ y el ratio DMQ/CoQ en hígado, corazón y músculo, pero no en riñón, consideramos que este tejido podría ser una diana terapéutica importante, ya sea de forma aislada, o en actuación conjunta con el resto de tejidos periféricos.

Por tanto, sería muy interesante diseñar una estrategia dirigida a corregir el defecto molecular en los riñones, no solo como vía terapéutica, sino como una aproximación a nuevos mecanismos fisiopatológicos.

Eliana Barriocanal Casado

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Del presente trabajo podemos concluir que:

1. La rapamicina no puede considerarse una droga de uso general en el tratamiento de las enfermedades mitocondriales, sino que su uso en pacientes con enfermedad mitocondrial debe ser evaluado para cada caso considerando las particularidades de cada enfermedad mitocondrial.
2. La modulación de vías *downstream* de mTORC1, como la inducción de autofagia o la inhibición de la síntesis de lípidos y proteínas, tampoco tiene efecto terapéutico en la encefalopatía mitocondrial asociada a deficiencia en CoQ.
3. El vector lentiviral CCoq9WP generado en este estudio es capaz de corregir el déficit bioenergético en células con la mutación *Coq9*^{R239X} a través de la sobreexpresión de las proteínas COQ9 y COQ7, ofreciendo la posibilidad del uso de vectores lentivirales como herramienta para las estrategias de terapia génica *in vivo* y *ex vivo* en el tratamiento de las deficiencias primarias en CoQ.
4. La estrategia de terapia *ex vivo* (celular-génica) muestra varias limitaciones que será necesario abordar para analizar el potencial

Eliana Barriocanal Casado

terapéutico de dicha estrategia en el tratamiento de la encefalopatía mitocondrial causada por deficiencia en CoQ.

5. La estrategia de terapia génica *in vivo* con vectores adenoasociados AAV9/Coq9 ha demostrado la relevancia del cerebro y/o los riñones en la patofisiología de la encefalopatía mitocondrial asociada a deficiencia en CoQ.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. Rapamycin can not be considered as a general drug for the treatment of mitochondrial diseases. The use of rapamycin in patients with mitochondrial disease must be evaluated for each case considering the particularities of each mitochondrial disease.
2. The modulation of mTORC1 downstream pathways, such as the autophagy induction or the inhibition of lipid and protein synthesis, do not show therapeutic benefits for the mitochondrial encephalopathy due to CoQ deficiency.
3. The lentiviral vector CCoq9WP generated in this study is able to correct the bioenergetic deficiency in cells from *Coq9*^{R239X} mice by the overexpression of COQ9 and COQ7 proteins, opening the possibility of using the lentiviral vectors as a tool for *in vivo* and *ex vivo* GT strategies for the treatment of CoQ deficiencies.
4. Our *ex vivo* gene-cell therapy assay shows several limitations that it is necessary to overcome to check the therapeutic potential of this strategy.
5. Our *in vivo* gene therapy study using the AAV9/Coq9 adenoassociated vectors shows the importance of the brain and/or the kidneys

Eliana Barriocanal Casado

involvement in the pathophysiology of the mitochondrial encephalopathy associated to CoQ deficiency.

BIBLIOGRAFÍA

- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*, 32(4), 529-539. doi:10.1016/j.molcel.2008.10.021
- Aeby, A., Sznajer, Y., Cavé, H., Rebuffat, E., Van Coster, R., Rigal, O., & Van Bogaert, P. (2007). Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome associated with muscular coenzyme Q10 deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 30(5), 827. doi:10.1007/s10545-007-0612-0
- Alcázar-Fabra, M., Trevisson, E., & Brea-Calvo, G. (2018). Clinical syndromes associated with Coenzyme Q. *Essays Biochem*, 62(3), 377-398. doi:10.1042/EBC20170107
- Allan, C. M., Awad, A. M., Johnson, J. S., Shirasaki, D. I., Wang, C., Blaby-Haas, C. E., . . . Clarke, C. F. (2015). Identification of Coq11, a new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 290(12), 7517-7534. doi:10.1074/jbc.M114.633131
- Awad, A. M., Bradley, M. C., Fernández-Del-Río, L., Nag, A., Tsui, H. S., & Clarke, C. F. (2018). Coenzyme Q. *Essays Biochem*, 62(3), 361-376. doi:10.1042/EBC20170106
- Bacman, S. R., Kauppila, J. H. K., Pereira, C. V., Nissanka, N., Miranda, M., Pinto, M., . . . Moraes, C. T. (2018). MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA. *Nat Med*, 24(11), 1696-1700. doi:10.1038/s41591-018-0166-8
- Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M. O., & Enríquez, J. A. (2012). NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab*, 16(3), 378-386. doi:10.1016/j.cmet.2012.07.015
- Barca, E., Kleiner, G., Tang, G., Ziosi, M., Tadesse, S., Masliah, E., . . . Quinzii, C. M. (2016). Decreased Coenzyme Q10 Levels in Multiple System Atrophy Cerebellum. *J Neuropathol Exp Neurol*, 75(7), 663-672. doi:10.1093/jnen/nlw037
- Barros, M. H., Johnson, A., Gin, P., Marbois, B. N., Clarke, C. F., & Tzagoloff, A. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *J Biol Chem*, 280(52), 42627-42635. doi:10.1074/jbc.M510768200
- Benabdellah, K., Cobo, M., Muñoz, P., Toscano, M. G., & Martin, F. (2011). Development of an all-in-one lentiviral vector system based on the original TetR for the easy generation of Tet-ON cell lines. *PLoS One*, 6(8), e23734. doi:10.1371/journal.pone.0023734

- Bentinger, M., Brismar, K., & Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7 Suppl, S41-50. doi:10.1016/j.mito.2007.02.006
- Bentinger, M., Tekle, M., & Dallner, G. (2010). Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(1), 74-79. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.147
- Bentinger, M., Turunen, M., Zhang, X. X., Wan, Y. J., & Dallner, G. (2003). Involvement of retinoid X receptor alpha in coenzyme Q metabolism. *J Mol Biol*, 326(3), 795-803.
- Bhaumik, M., Muller, V. J., Rozaklis, T., Johnson, L., Dobrenis, K., Bhattacharyya, R., . . . Stanley, P. (1999). A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome). *Glycobiology*, 9(12), 1389-1396.
- Biffi, A. (2017). Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Storage Disease: Current and New Indications. *Mol Ther*, 25(5), 1155-1162. doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.025
- Biffi, A., Capotondo, A., Fasano, S., del Carro, U., Marchesini, S., Azuma, H., . . . Naldini, L. (2006). Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 3070-3082. doi:10.1172/JCI28873
- Biffi, A., De Palma, M., Quattrini, A., Del Carro, U., Amadio, S., Visigalli, I., . . . Naldini, L. (2004). Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *J Clin Invest*, 113(8), 1118-1129. doi:10.1172/JCI19205
- Biffi, A., Montini, E., Lorioli, L., Cesani, M., Fumagalli, F., Plati, T., . . . Naldini, L. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*, 341(6148), 1233158. doi:10.1126/science.1233158
- Bottani, E., Giordano, C., Civiletto, G., Di Meo, I., Auricchio, A., Ciusani, E., . . . Zeviani, M. (2014). AAV-mediated liver-specific MPV17 expression restores mtDNA levels and prevents diet-induced liver failure. *Mol Ther*, 22(1), 10-17. doi:10.1038/mt.2013.230
- Bowers, W. J., Breakefield, X. O., & Sena-Esteves, M. (2011). Genetic therapy for the nervous system. *Hum Mol Genet*, 20(R1), R28-41. doi:10.1093/hmg/ddr110
- Brea-Calvo, G., Siendones, E., Sánchez-Alcázar, J. A., de Cabo, R., & Navas, P. (2009). Cell survival from chemotherapy depends on NF-kappaB transcriptional up-regulation of coenzyme Q biosynthesis. *PLoS One*, 4(4), e5301. doi:10.1371/journal.pone.0005301

- Busso, C., Bleicher, L., Ferreira-Júnior, J. R., & Barros, M. H. (2010). Site-directed mutagenesis and structural modeling of Coq10p indicate the presence of a tunnel for coenzyme Q6 binding. *FEBS Lett*, *584*(8), 1609-1614. doi:10.1016/j.febslet.2010.03.024
- Calvo, S. E., Clauser, K. R., & Mootha, V. K. (2016). MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res*, *44*(D1), D1251-1257. doi:10.1093/nar/gkv1003
- Camp, K. M., Krotoski, D., Parisi, M. A., Gwinn, K. A., Cohen, B. H., Cox, C. S., . . . Coates, P. M. (2016). Nutritional interventions in primary mitochondrial disorders: Developing an evidence base. *Mol Genet Metab*, *119*(3), 187-206. doi:10.1016/j.ymgme.2016.09.002
- Capotondo, A., Milazzo, R., Garcia-Manteiga, J. M., Cavalca, E., Montepeloso, A., Garrison, B. S., . . . Biffi, A. (2017). Intracerebroventricular delivery of hematopoietic progenitors results in rapid and robust engraftment of microglia-like cells. *Sci Adv*, *3*(12), e1701211. doi:10.1126/sciadv.1701211
- Capotondo, A., Milazzo, R., Politi, L. S., Quattrini, A., Palini, A., Plati, T., . . . Biffi, A. (2012). Brain conditioning is instrumental for successful microglia reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(37), 15018-15023. doi:10.1073/pnas.1205858109
- Carrillo-Galvez, A. B., Cobo, M., Cuevas-Ocaña, S., Gutiérrez-Guerrero, A., Sánchez-Gilabert, A., Bongarzone, P., . . . Anderson, P. (2015). Mesenchymal stromal cells express GARP/LRRC32 on their surface: effects on their biology and immunomodulatory capacity. *Stem Cells*, *33*(1), 183-195. doi:10.1002/stem.1821
- Cascajo, M. V., Abdelmohsen, K., Noh, J. H., Fernández-Ayala, D. J., Willers, I. M., Brea, G., . . . Navas, P. (2016). RNA-binding proteins regulate cell respiration and coenzyme Q biosynthesis by post-transcriptional regulation of COQ7. *RNA Biol*, *13*(7), 622-634. doi:10.1080/15476286.2015.1119366
- Castellotti, B., Mariotti, C., Rimoldi, M., Fancellu, R., Plumari, M., Caimi, S., . . . Gellera, C. (2011). Ataxia with oculomotor apraxia type1 (AOA1): novel and recurrent aprataxin mutations, coenzyme Q10 analyses, and clinical findings in Italian patients. *Neurogenetics*, *12*(3), 193-201. doi:10.1007/s10048-011-0281-x
- Cerutti, R., Pirinen, E., Lamperti, C., Marchet, S., Sauve, A. A., Li, W., . . . Zeviani, M. (2014). NAD(+)-dependent activation of Sirt1 corrects the phenotype in a mouse model of mitochondrial disease. *Cell Metab*, *19*(6), 1042-1049. doi:10.1016/j.cmet.2014.04.001

- Chance, B., Estabrook, R. W., & Lee, C. P. (1963). Electron Transport in the Oxysome. *Science*, *140*(3565), 379-380. doi:10.1126/science.140.3565.379-c
- Cho, Y. M., Kwon, S., Pak, Y. K., Seol, H. W., Choi, Y. M., Park, D. J., . . . Lee, H. K. (2006). Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *348*(4), 1472-1478. doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.020
- Civiletto, G., Dogan, S. A., Cerutti, R., Fagiolari, G., Moggio, M., Lamperti, C., . . . Zeviani, M. (2018). Rapamycin rescues mitochondrial myopathy via coordinated activation of autophagy and lysosomal biogenesis. *EMBO Mol Med*, *10*(11). doi:10.15252/emmm.201708799
- Civiletto, G., Varanita, T., Cerutti, R., Gorletta, T., Barbaro, S., Marchet, S., . . . Zeviani, M. (2015). Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models. *Cell Metab*, *21*(6), 845-854. doi:10.1016/j.cmet.2015.04.016
- Craven, L., Alston, C. L., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2017). Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, *18*, 257-275. doi:10.1146/annurev-genom-091416-035426
- Cui, T. Z., & Kawamukai, M. (2009). Coq10, a mitochondrial coenzyme Q binding protein, is required for proper respiration in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS J*, *276*(3), 748-759. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06821.x
- Danhauser, K., Herebian, D., Haack, T. B., Rodenburg, R. J., Strom, T. M., Meitinger, T., . . . Distelmaier, F. (2016). Fatal neonatal encephalopathy and lactic acidosis caused by a homozygous loss-of-function variant in COQ9. *Eur J Hum Genet*, *24*(3), 450-454. doi:10.1038/ejhg.2015.133
- Delgado, M., Toscano, M. G., Benabdellah, K., Cobo, M., O'Valle, F., Gonzalez-Rey, E., & Martín, F. (2008). In vivo delivery of lentiviral vectors expressing vasoactive intestinal peptide complementary DNA as gene therapy for collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, *58*(4), 1026-1037. doi:10.1002/art.23283
- Demers-Lamarche, J., Guillebaud, G., Tlili, M., Todkar, K., Bélanger, N., Grondin, M., . . . Germain, M. (2016). Loss of Mitochondrial Function Impairs Lysosomes. *J Biol Chem*, *291*(19), 10263-10276. doi:10.1074/jbc.M115.695825
- Desbats, M. A., Lunardi, G., Doimo, M., Trevisson, E., & Salviati, L. (2015). Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ 10) deficiency. *J Inherit Metab Dis*, *38*(1), 145-156. doi:10.1007/s10545-014-9749-9

- Di Meo, I., Auricchio, A., Lamperti, C., Burlina, A., Viscomi, C., & Zeviani, M. (2012). Effective AAV-mediated gene therapy in a mouse model of ethylmalonic encephalopathy. *EMBO Mol Med*, *4*(9), 1008-1014. doi:10.1002/emmm.201201433
- Di Meo, I., Marchet, S., Lamperti, C., Zeviani, M., & Viscomi, C. (2017). AAV9-based gene therapy partially ameliorates the clinical phenotype of a mouse model of Leigh syndrome. *Gene Ther*, *24*(10), 661-667. doi:10.1038/gt.2017.53
- Di Prospero, N. A., Baker, A., Jeffries, N., & Fischbeck, K. H. (2007). Neurological effects of high-dose idebenone in patients with Friedreich's ataxia: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, *6*(10), 878-886. doi:10.1016/S1474-4422(07)70220-X
- Di Prospero, N. A., Sumner, C. J., Penzak, S. R., Ravina, B., Fischbeck, K. H., & Taylor, J. P. (2007). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose idebenone in patients with Friedreich ataxia. *Arch Neurol*, *64*(6), 803-808. doi:10.1001/archneur.64.6.803
- Di, R., Wu, X., Chang, Z., Zhao, X., Feng, Q., Lu, S., . . . Yang, Z. (2012). S6K inhibition renders cardiac protection against myocardial infarction through PDK1 phosphorylation of Akt. *Biochem J*, *441*(1), 199-207. doi:10.1042/BJ20110033
- Diaz, F., Garcia, S., Padgett, K. R., & Moraes, C. T. (2012). A defect in the mitochondrial complex III, but not complex IV, triggers early ROS-dependent damage in defined brain regions. *Hum Mol Genet*, *21*(23), 5066-5077. doi:10.1093/hmg/dds350
- Duberley, K. E., Abramov, A. Y., Chalasani, A., Heales, S. J., Rahman, S., & Hargreaves, I. P. (2013). Human neuronal coenzyme Q10 deficiency results in global loss of mitochondrial respiratory chain activity, increased mitochondrial oxidative stress and reversal of ATP synthase activity: implications for pathogenesis and treatment. *J Inherit Metab Dis*, *36*(1), 63-73. doi:10.1007/s10545-012-9511-0
- Duncan, A. J., Bitner-Glindzicz, M., Meunier, B., Costello, H., Hargreaves, I. P., López, L. C., . . . Rahman, S. (2009). A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *Am J Hum Genet*, *84*(5), 558-566. doi:10.1016/j.ajhg.2009.03.018
- Echtay, K. S., Winkler, E., & Klingenberg, M. (2000). Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature*, *408*(6812), 609-613. doi:10.1038/35046114
- El-Hattab, A. W., Hsu, J. W., Emrick, L. T., Wong, L. J., Craigen, W. J., Jahoor, F., & Scaglia, F. (2012). Restoration of impaired nitric oxide production in MELAS syndrome with citrulline and arginine

- supplementation. *Mol Genet Metab*, 105(4), 607-614. doi:10.1016/j.yimgme.2012.01.016
- Emmanuele, V., López, L. C., López, L., Berardo, A., Naini, A., Tadesse, S., . . . Hirano, M. (2012). Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review. *Arch Neurol*, 69(8), 978-983. doi:10.1001/archneurol.2012.206
- Enriquez, J. A., & Lenaz, G. (2014). Coenzyme q and the respiratory chain: coenzyme q pool and mitochondrial supercomplexes. *Mol Syndromol*, 5(3-4), 119-140. doi:10.1159/000363364
- Enríquez, J. A. (2016). Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu Rev Physiol*, 78, 533-561. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105031
- Esteves, T. C., Echtay, K. S., Jonassen, T., Clarke, C. F., & Brand, M. D. (2004). Ubiquinone is not required for proton conductance by uncoupling protein 1 in yeast mitochondria. *Biochem J*, 379(Pt 2), 309-315. doi:10.1042/bj20031682
- Fazakerley, D. J., Chaudhuri, R., Yang, P., Maghzal, G. J., Thomas, K. C., Krycer, J. R., . . . James, D. E. (2018). Mitochondrial CoQ deficiency is a common driver of mitochondrial oxidants and insulin resistance. *Elife*, 7. doi:10.7554/eLife.32111
- Felici, R., Buonvicino, D., Muzzi, M., Cavone, L., Guasti, D., Lapucci, A., . . . Chiarugi, A. (2017). Post onset, oral rapamycin treatment delays development of mitochondrial encephalopathy only at supramaximal doses. *Neuropharmacology*, 117, 74-84. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.01.039
- Flierl, A., Chen, Y., Coskun, P. E., Samulski, R. J., & Wallace, D. C. (2005). Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther*, 12(7), 570-578. doi:10.1038/sj.gt.3302443
- Fontaine, E., Ichas, F., & Bernardi, P. (1998). A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 273(40), 25734-25740.
- Fratantoni, J. C., Hall, C. W., & Neufeld, E. F. (1968). Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. *Science*, 162(3853), 570-572.
- Gammage, P. A., Viscomi, C., Simard, M. L., Costa, A. S. H., Gaude, E., Powell, C. A., . . . Minczuk, M. (2018). Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo. *Nat Med*, 24(11), 1691-1695. doi:10.1038/s41591-018-0165-9
- García-Corzo, L., Luna-Sánchez, M., Doerrier, C., García, J. A., Guarás, A., Acín-Pérez, R., . . . López, L. C. (2013). Dysfunctional Coq9 protein causes predominant encephalomyopathy associated with CoQ

- deficiency. *Hum Mol Genet*, 22(6), 1233-1248. doi:10.1093/hmg/dds530
- García-Corzo, L., Luna-Sánchez, M., Doerrier, C., Ortiz, F., Escames, G., Acuña-Castroviejo, D., & López, L. C. (2014). Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated with CoQ deficiency. *Biochim Biophys Acta*, 1842(7), 893-901. doi:10.1016/j.bbadis.2014.02.008
- Garone, C., Garcia-Diaz, B., Emmanuele, V., Lopez, L. C., Tadesse, S., Akman, H. O., . . . Hirano, M. (2014). Deoxypyrimidine monophosphate bypass therapy for thymidine kinase 2 deficiency. *EMBO Mol Med*, 6(8), 1016-1027. doi:10.15252/emmm.201404092
- Gempel, K., Topaloglu, H., Talim, B., Schneiderat, P., Schoser, B. G., Hans, V. H., . . . Horvath, R. (2007). The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Brain*, 130(Pt 8), 2037-2044. doi:10.1093/brain/awm054
- Gentner, B., Visigalli, I., Hiramatsu, H., Lechman, E., Ungari, S., Giustacchini, A., . . . Naldini, L. (2010). Identification of hematopoietic stem cell-specific miRNAs enables gene therapy of globoid cell leukodystrophy. *Sci Transl Med*, 2(58), 58ra84. doi:10.1126/scitranslmed.3001522
- Geraerts, M., Eggermont, K., Hernandez-Acosta, P., Garcia-Verdugo, J. M., Baekelandt, V., & Debyser, Z. (2006). Lentiviral vectors mediate efficient and stable gene transfer in adult neural stem cells in vivo. *Hum Gene Ther*, 17(6), 635-650. doi:10.1089/hum.2006.17.635
- Gerards, M., Kamps, R., van Oevelen, J., Boesten, I., Jongen, E., de Koning, B., . . . Smeets, H. (2013). Exome sequencing reveals a novel Moroccan founder mutation in SLC19A3 as a new cause of early-childhood fatal Leigh syndrome. *Brain*, 136(Pt 3), 882-890. doi:10.1093/brain/awt013
- Gomes, F., Tahara, E. B., Busso, C., Kowaltowski, A. J., & Barros, M. H. (2013). nde1 deletion improves mitochondrial DNA maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* coenzyme Q mutants. *Biochem J*, 449(3), 595-603. doi:10.1042/BJ20121432
- González-Mariscal, I., García-Testón, E., Padilla, S., Martín-Montalvo, A., Pomares-Viciano, T., Vazquez-Fonseca, L., . . . Santos-Ocaña, C. (2014). Regulation of coenzyme Q biosynthesis in yeast: a new complex in the block. *IUBMB Life*, 66(2), 63-70. doi:10.1002/iub.1243
- Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., . . . Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16080. doi:10.1038/nrdp.2016.80

- Green, D. E., & Tzagoloff, A. (1966). The mitochondrial electron transfer chain. *Arch Biochem Biophys*, *116*(1), 293-304.
- Haas, D., Niklowitz, P., Hörster, F., Baumgartner, E. R., Prasad, C., Rodenburg, R. J., . . . Okun, J. G. (2009). Coenzyme Q(10) is decreased in fibroblasts of patients with methylmalonic aciduria but not in mevalonic aciduria. *J Inherit Metab Dis*, *32*(4), 570-575. doi:10.1007/s10545-009-1150-8
- Hackenbrock, C. R., Chazotte, B., & Gupte, S. S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr*, *18*(5), 331-368.
- Halter, J. P., Michael, W., Schüpbach, M., Mandel, H., Casali, C., Orchard, K., . . . Hirano, M. (2015). Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain*, *138*(Pt 10), 2847-2858. doi:10.1093/brain/awv226
- Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., . . . Miller, R. A. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, *460*(7253), 392-395. doi:10.1038/nature08221
- Hasilik, A., Klein, U., Waheed, A., Strecker, G., & von Figura, K. (1980). Phosphorylated oligosaccharides in lysosomal enzymes: identification of alpha-N-acetylglucosamine(1)phospho(6)mannose diester groups. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *77*(12), 7074-7078.
- Herrmann, J. M., & Riemer, J. (2010). The intermembrane space of mitochondria. *Antioxid Redox Signal*, *13*(9), 1341-1358. doi:10.1089/ars.2009.3063
- Hess, B., Saftig, P., Hartmann, D., Coenen, R., Lüllmann-Rauch, R., Goebel, H. H., . . . Gieselmann, V. (1996). Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(25), 14821-14826.
- Hidalgo-Gutiérrez, A., Barriocanal-Casado, E., Bakkali, M., Díaz-Casado, M. E., Sánchez-Maldonado, L., Romero, M., . . . López, L. C. (2019). β -RA reduces DMQ/CoQ ratio and rescues the encephalopathic phenotype in. *EMBO Mol Med*, *11*(1). doi:10.15252/emmm.201809466
- Hirano, M., Emmanuele, V., & Quinzii, C. M. (2018). Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays Biochem*, *62*(3), 467-481. doi:10.1042/EBC20170114
- Hsieh, E. J., Gin, P., Gulmezian, M., Tran, U. C., Saiki, R., Marbois, B. N., & Clarke, C. F. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a

- subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Arch Biochem Biophys*, 463(1), 19-26. doi:10.1016/j.abb.2007.02.016
- Hughes, B. G., Harrison, P. M., & Hekimi, S. (2017). Estimating the occurrence of primary ubiquinone deficiency by analysis of large-scale sequencing data. *Sci Rep*, 7(1), 17744. doi:10.1038/s41598-017-17564-y
- Hägerhäll, C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta*, 1320(2), 107-141.
- Hüttemann, M., Pecina, P., Rainbolt, M., Sanderson, T. H., Kagan, V. E., Samavati, L., . . . Lee, I. (2011). The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion*, 11(3), 369-381. doi:10.1016/j.mito.2011.01.010
- Ito, T. K., Lu, C., Khan, J., Nguyen, Q., Huang, H. Z., Kim, D., . . . Kaeberlein, M. (2017). Hepatic S6K1 Partially Regulates Lifespan of Mice with Mitochondrial Complex I Deficiency. *Front Genet*, 8, 113. doi:10.3389/fgene.2017.00113
- Jaburek, M., & Garlid, K. D. (2003). Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10. *J Biol Chem*, 278(28), 25825-25831. doi:10.1074/jbc.M302126200
- Jain, I. H., Zazzeron, L., Goli, R., Alexa, K., Schatzman-Bone, S., Dhillon, H., . . . Mootha, V. K. (2016). Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science*, 352(6281), 54-61. doi:10.1126/science.aad9642
- Jakobsson, J., & Lundberg, C. (2006). Lentiviral vectors for use in the central nervous system. *Mol Ther*, 13(3), 484-493. doi:10.1016/j.ymthe.2005.11.012
- Johnson, A., Gin, P., Marbois, B. N., Hsieh, E. J., Wu, M., Barros, M. H., . . . Tzagoloff, A. (2005). COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 280(36), 31397-31404. doi:10.1074/jbc.M503277200
- Johnson, S. C., Yanos, M. E., Bitto, A., Castanza, A., Gagnidze, A., Gonzalez, B., . . . Kaeberlein, M. (2015). Dose-dependent effects of mTOR inhibition on weight and mitochondrial disease in mice. *Front Genet*, 6, 247. doi:10.3389/fgene.2015.00247
- Johnson, S. C., Yanos, M. E., Kayser, E. B., Quintana, A., Sangesland, M., Castanza, A., . . . Kaeberlein, M. (2013). mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science*, 342(6165), 1524-1528. doi:10.1126/science.1244360
- Jopling, C., & Rosendaal, M. (2001). A cautionary tale: how to delete mouse haemopoietic stem cells with busulphan. *Br J Haematol*, 113(4), 970-974.

- Karaa, A., Kriger, J., Grier, J., Holbert, A., Thompson, J. L., Parikh, S., & Hirano, M. (2016). Mitochondrial disease patients' perception of dietary supplements' use. *Mol Genet Metab*, *119*(1-2), 100-108. doi:10.1016/j.ymgme.2016.07.005
- Kawamukai, M. (2016). Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Biosci Biotechnol Biochem*, *80*(1), 23-33. doi:10.1080/09168451.2015.1065172
- Keilin, D., & Hartree, E. F. (1947). Activity of the cytochrome system in heart muscle preparations. *Biochem J*, *41*(4), 500-502.
- Kemp, K. C., Hares, K., Redondo, J., Cook, A. J., Haynes, H. R., Burton, B. R., . . . Wilkins, A. (2018). Bone marrow transplantation stimulates neural repair in Friedreich's ataxia mice. *Ann Neurol*, *83*(4), 779-793. doi:10.1002/ana.25207
- Kerr, D. S. (2013). Review of clinical trials for mitochondrial disorders: 1997-2012. *Neurotherapeutics*, *10*(2), 307-319. doi:10.1007/s13311-013-0176-7
- Khan, N. A., Auranen, M., Paetau, I., Pirinen, E., Euro, L., Forsström, S., . . . Suomalainen, A. (2014). Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Mol Med*, *6*(6), 721-731. doi:10.1002/emmm.201403943
- Khan, N. A., Nikkanen, J., Yatsuga, S., Jackson, C., Wang, L., Pradhan, S., . . . Suomalainen, A. (2017). mTORC1 Regulates Mitochondrial Integrated Stress Response and Mitochondrial Myopathy Progression. *Cell Metab*, *26*(2), 419-428.e415. doi:10.1016/j.cmet.2017.07.007
- King, M. S., Thompson, K., Hopton, S., He, L., Kunji, E. R. S., Taylor, R. W., & Ortiz-Gonzalez, X. R. (2018). Expanding the phenotype of de novo. *Neurol Genet*, *4*(4), e256. doi:10.1212/NXG.0000000000000256
- Kirby, D. M., Thorburn, D. R., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2007). Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol*, *80*, 93-119. doi:10.1016/S0091-679X(06)80004-X
- Kleiner, G., Barca, E., Ziosi, M., Emmanuele, V., Xu, Y., Hidalgo-Gutierrez, A., . . . Quinzii, C. M. (2018). CoQ₁₀ supplementation rescues nephrotic syndrome through normalization of H₂S oxidation pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, *1864*(11), 3708-3722. doi:10.1016/j.bbadis.2018.09.002
- Klopstock, T., Metz, G., Yu-Wai-Man, P., Büchner, B., Gallenmüller, C., Bailie, M., . . . Chinnery, P. F. (2013). Persistence of the treatment effect of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*, *136*(Pt 2), e230. doi:10.1093/brain/aws279
- Klopstock, T., Yu-Wai-Man, P., Dimitriadis, K., Rouleau, J., Heck, S., Bailie, M., . . . Chinnery, P. F. (2011). A randomized placebo-

- controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*, 134(Pt 9), 2677-2686. doi:10.1093/brain/awr170
- Koenig, M. K., Emrick, L., Karaa, A., Korson, M., Scaglia, F., Parikh, S., & Goldstein, A. (2016). Recommendations for the Management of Strokelike Episodes in Patients With Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Strokelike Episodes. *JAMA Neurol*, 73(5), 591-594. doi:10.1001/jamaneurol.2015.5072
- Koga, Y., Akita, Y., Junko, N., Yatsuga, S., Povalko, N., Fukiyama, R., . . . Matsuishi, T. (2006). Endothelial dysfunction in MELAS improved by l-arginine supplementation. *Neurology*, 66(11), 1766-1769. doi:10.1212/01.wnl.0000220197.36849.1e
- Koga, Y., Akita, Y., Nishioka, J., Yatsuga, S., Povalko, N., Tanabe, Y., . . . Matsuishi, T. (2005). L-arginine improves the symptoms of strokelike episodes in MELAS. *Neurology*, 64(4), 710-712. doi:10.1212/01.WNL.0000151976.60624.01
- Koga, Y., Povalko, N., Nishioka, J., Katayama, K., Kakimoto, N., & Matsuishi, T. (2010). MELAS and L-arginine therapy: pathophysiology of stroke-like episodes. *Ann N Y Acad Sci*, 1201, 104-110. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05624.x
- Krivit, W., Aubourg, P., Shapiro, E., & Peters, C. (1999). Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, and Hurler syndrome. *Curr Opin Hematol*, 6(6), 377-382.
- Kühl, I., Miranda, M., Atanassov, I., Kuznetsova, I., Hinze, Y., Mourier, A., . . . Larsson, N. G. (2017). Transcriptomic and proteomic landscape of mitochondrial dysfunction reveals secondary coenzyme Q deficiency in mammals. *Elife*, 6. doi:10.7554/eLife.30952
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol*, 13, 89. doi:10.1186/s12915-015-0201-x
- Lampron, A., Lessard, M., & Rivest, S. (2012). Effects of myeloablation, peripheral chimerism, and whole-body irradiation on the entry of bone marrow-derived cells into the brain. *Cell Transplant*, 21(6), 1149-1159. doi:10.3727/096368911X593154
- Langford-Smith, A., Wilkinson, F. L., Langford-Smith, K. J., Holley, R. J., Sergijenko, A., Howe, S. J., . . . Bigger, B. W. (2012). Hematopoietic stem cell and gene therapy corrects primary neuropathology and behavior in mucopolysaccharidosis IIIA mice. *Mol Ther*, 20(8), 1610-1621. doi:10.1038/mt.2012.82
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017

- Lapointe, C. P., Stefely, J. A., Jochem, A., Hutchins, P. D., Wilson, G. M., Kwiecien, N. W., . . . Pagliarini, D. J. (2018). Multi-omics Reveal Specific Targets of the RNA-Binding Protein Puf3p and Its Orchestration of Mitochondrial Biogenesis. *Cell Syst*, 6(1), 125-135.e126. doi:10.1016/j.cels.2017.11.012
- Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., . . . Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*, 340(6140), 1567-1570. doi:10.1126/science.1230381
- Lau, A. A., Hannouche, H., Rozaklis, T., Hassiotis, S., Hopwood, J. J., & Hemsley, K. M. (2010). Allogeneic stem cell transplantation does not improve neurological deficits in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. *Exp Neurol*, 225(2), 445-454. doi:10.1016/j.expneurol.2010.07.024
- Lemieux, H., Blier, P. U., & Gnaiger, E. (2017). Remodeling pathway control of mitochondrial respiratory capacity by temperature in mouse heart: electron flow through the Q-junction in permeabilized fibers. *Sci Rep*, 7(1), 2840. doi:10.1038/s41598-017-02789-8
- Letts, J. A., & Sazanov, L. A. (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol*, 24(10), 800-808. doi:10.1038/nsmb.3460
- Li, J., Kim, S. G., & Blenis, J. (2014). Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*, 19(3), 373-379. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.001
- Liesa, M., & Shirihai, O. S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*, 17(4), 491-506. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.002
- Littarru, G. P., & Langsjoen, P. (2007). Coenzyme Q10 and statins: biochemical and clinical implications. *Mitochondrion*, 7 Suppl, S168-174. doi:10.1016/j.mito.2007.03.002
- Lohman, D. C., Forouhar, F., Beebe, E. T., Stefely, M. S., Minogue, C. E., Ulbrich, A., . . . Pagliarini, D. J. (2014). Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(44), E4697-4705. doi:10.1073/pnas.1413128111
- Lopez-Gomez, C., Levy, R. J., Sanchez-Quintero, M. J., Juanola-Falgarona, M., Barca, E., Garcia-Diaz, B., . . . Hirano, M. (2017). Deoxycytidine and Deoxythymidine Treatment for Thymidine Kinase 2 Deficiency. *Ann Neurol*, 81(5), 641-652. doi:10.1002/ana.24922
- Luna-Sánchez, M., Díaz-Casado, E., Barca, E., Tejada, M., Montilla-García, Á., Cobos, E. J., . . . López, L. C. (2015). The clinical heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency results from genotypic differences in the

- Coq9 gene. *EMBO Mol Med*, 7(5), 670-687. doi:10.15252/emmm.201404632
- Luna-Sánchez, M., Hidalgo-Gutiérrez, A., Hildebrandt, T. M., Chaves-Serrano, J., Barriocanal-Casado, E., Santos-Fandila, Á., . . . López, L. C. (2017). CoQ deficiency causes disruption of mitochondrial sulfide oxidation, a new pathomechanism associated with this syndrome. *EMBO Mol Med*, 9(1), 78-95. doi:10.15252/emmm.201606345
- Lynch, D. R., Perlman, S. L., & Meier, T. (2010). A phase 3, double-blind, placebo-controlled trial of idebenone in friedreich ataxia. *Arch Neurol*, 67(8), 941-947. doi:10.1001/archneurol.2010.168
- López, L. C., Quinzii, C. M., Area, E., Naini, A., Rahman, S., Schuelke, M., . . . Hirano, M. (2010). Treatment of CoQ(10) deficient fibroblasts with ubiquinone, CoQ analogs, and vitamin C: time- and compound-dependent effects. *PLoS One*, 5(7), e11897. doi:10.1371/journal.pone.0011897
- López-Martín, J. M., Salviati, L., Trevisson, E., Montini, G., DiMauro, S., Quinzii, C., . . . Navas, P. (2007). Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis. *Hum Mol Genet*, 16(9), 1091-1097. doi:10.1093/hmg/ddm058
- Marbois, B., Gin, P., Gulmezian, M., & Clarke, C. F. (2009). The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for coenzyme Q biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1791(1), 69-75. doi:10.1016/j.bbali.2008.10.006
- Mariotti, C., Solari, A., Torta, D., Marano, L., Fiorentini, C., & Di Donato, S. (2003). Idebenone treatment in Friedreich patients: one-year-long randomized placebo-controlled trial. *Neurology*, 60(10), 1676-1679.
- Martín-Montalvo, A., González-Mariscal, I., Pomares-Viciano, T., Padilla-López, S., Ballesteros, M., Vazquez-Fonseca, L., . . . Santos-Ocaña, C. (2013). The phosphatase Ptc7 induces coenzyme Q biosynthesis by activating the hydroxylase Coq7 in yeast. *J Biol Chem*, 288(39), 28126-28137. doi:10.1074/jbc.M113.474494
- McCormack, S., Polyak, E., Ostrovsky, J., Dingley, S. D., Rao, M., Kwon, Y. J., . . . Falk, M. J. (2015). Pharmacologic targeting of sirtuin and PPAR signaling improves longevity and mitochondrial physiology in respiratory chain complex I mutant *Caenorhabditis elegans*. *Mitochondrion*, 22, 45-59. doi:10.1016/j.mito.2015.02.005
- McFarland, R., Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2010). A neurological perspective on mitochondrial disease. *Lancet Neurol*, 9(8), 829-840. doi:10.1016/S1474-4422(10)70116-2
- Meneghini, V., Lattanzi, A., Tiradani, L., Bravo, G., Morena, F., Sanvito, F., . . . Gritti, A. (2016). Pervasive supply of therapeutic lysosomal

- enzymes in the CNS of normal and Krabbe-affected non-human primates by intracerebral lentiviral gene therapy. *EMBO Mol Med*, 8(5), 489-510. doi:10.15252/emmm.201505850
- Metodiev, M. D., Gerber, S., Hubert, L., Delahodde, A., Chretien, D., Gérard, X., . . . Besmond, C. (2014). Mutations in the tricarboxylic acid cycle enzyme, aconitase 2, cause either isolated or syndromic optic neuropathy with encephalopathy and cerebellar atrophy. *J Med Genet*, 51(12), 834-838. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102532
- Montero, R., Grazina, M., López-Gallardo, E., Montoya, J., Briones, P., Navarro-Sastre, A., . . . Group, C. Q. D. S. (2013). Coenzyme Q₁₀ deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion*, 13(4), 337-341. doi:10.1016/j.mito.2013.04.001
- Montini, G., Malaventura, C., & Salviati, L. (2008). Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency. *N Engl J Med*, 358(26), 2849-2850. doi:10.1056/NEJMc0800582
- Moreno-Loshuertos, R., & Enríquez, J. A. (2016). Respiratory supercomplexes and the functional segmentation of the CoQ pool. *Free Radic Biol Med*, 100, 5-13. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.018
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1), 1-13. doi:10.1042/BJ20081386
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526(7573), 351-360. doi:10.1038/nature15818
- Naldini, L. (2019). Genetic engineering of hematopoiesis: current stage of clinical translation and future perspectives. *EMBO Mol Med*, 11(3). doi:10.15252/emmm.201809958
- Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., & Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta*, 1504(1), 82-106.
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145-1159. doi:10.1016/j.cell.2012.02.035
- O'Brien, L. C., Keeney, P. M., & Bennett, J. P. (2015). Differentiation of Human Neural Stem Cells into Motor Neurons Stimulates Mitochondrial Biogenesis and Decreases Glycolytic Flux. *Stem Cells Dev*, 24(17), 1984-1994. doi:10.1089/scd.2015.0076
- Olsen, R. K., Olpin, S. E., Andresen, B. S., Miedzybrodzka, Z. H., Pourfarzam, M., Merinero, B., . . . Morris, A. A. (2007). ETFDH mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Brain*, 130(Pt 8), 2045-2054. doi:10.1093/brain/awm135

- Owusu-Ansah, E., & Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*, *461*(7263), 537-541. doi:10.1038/nature08313
- Padilla, S., Jonassen, T., Jiménez-Hidalgo, M. A., Fernández-Ayala, D. J., López-Lluch, G., Marbois, B., . . . Santos-Ocaña, C. (2004). Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and lacks antioxidant activity. *J Biol Chem*, *279*(25), 25995-26004. doi:10.1074/jbc.M400001200
- Palfi, S., Gurruchaga, J. M., Ralph, G. S., Lepetit, H., Lavis, S., Buttery, P. C., . . . Mitrophanous, K. A. (2014). Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*, *383*(9923), 1138-1146. doi:10.1016/S0140-6736(13)61939-X
- Papucci, L., Schiavone, N., Witort, E., Donnini, M., Lapucci, A., Tempestini, A., . . . Capaccioli, S. (2003). Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem*, *278*(30), 28220-28228. doi:10.1074/jbc.M302297200
- Parikh, S., Goldstein, A., Koenig, M. K., Scaglia, F., Enns, G. M., Saneto, R., . . . DiMauro, S. (2015). Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. *Genet Med*, *17*(9), 689-701. doi:10.1038/gim.2014.177
- Pearce, L. R., Alton, G. R., Richter, D. T., Kath, J. C., Lingardo, L., Chapman, J., . . . Alessi, D. R. (2010). Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1). *Biochem J*, *431*(2), 245-255. doi:10.1042/BJ20101024
- Peng, M., Ostrovsky, J., Kwon, Y. J., Polyak, E., Licata, J., Tsukikawa, M., . . . Falk, M. J. (2015). Inhibiting cytosolic translation and autophagy improves health in mitochondrial disease. *Hum Mol Genet*, *24*(17), 4829-4847. doi:10.1093/hmg/ddv207
- Peters, C., Steward, C. G., Program, N. M. D., Registry, I. B. M. T., & Working Party on Inborn Errors, E. r. B. M. T. G. (2003). Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant*, *31*(4), 229-239. doi:10.1038/sj.bmt.1703839
- Pfeffer, G., Majumdar, K., Turnbull, D. M., Thorburn, D., & Chinnery, P. F. (2012). Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev*(4), CD004426. doi:10.1002/14651858.CD004426.pub3
- Pierrel, F. (2017). Impact of Chemical Analogs of 4-Hydroxybenzoic Acid on Coenzyme Q Biosynthesis: From Inhibition to Bypass of

- Coenzyme Q Deficiency. *Front Physiol*, 8, 436. doi:10.3389/fphys.2017.00436
- Quinzii, C. M., Garone, C., Emmanuele, V., Tadesse, S., Krishna, S., Dorado, B., & Hirano, M. (2013). Tissue-specific oxidative stress and loss of mitochondria in CoQ-deficient Pdss2 mutant mice. *FASEB J*, 27(2), 612-621. doi:10.1096/fj.12-209361
- Quinzii, C. M., & Hirano, M. (2011). Primary and secondary CoQ(10) deficiencies in humans. *Biofactors*, 37(5), 361-365. doi:10.1002/biof.155
- Quinzii, C. M., Luna-Sanchez, M., Ziosi, M., Hidalgo-Gutierrez, A., Kleiner, G., & Lopez, L. C. (2017). The Role of Sulfide Oxidation Impairment in the Pathogenesis of Primary CoQ Deficiency. *Front Physiol*, 8, 525. doi:10.3389/fphys.2017.00525
- Quinzii, C. M., López, L. C., Gilkerson, R. W., Dorado, B., Coku, J., Naini, A. B., . . . Hirano, M. (2010). Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ10 deficiency. *FASEB J*, 24(10), 3733-3743. doi:10.1096/fj.09-152728
- Quinzii, C. M., López, L. C., Von-Moltke, J., Naini, A., Krishna, S., Schuelke, M., . . . Hirano, M. (2008). Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J*, 22(6), 1874-1885. doi:10.1096/fj.07-100149
- Rahman, S., Hargreaves, I., Clayton, P., & Heales, S. (2001). Neonatal presentation of coenzyme Q10 deficiency. *J Pediatr*, 139(3), 456-458. doi:10.1067/mpd.2001.117575
- Rocca, C. J., Goodman, S. M., Dulin, J. N., Haquang, J. H., Gertsman, I., Blondelle, J., . . . Cherqui, S. (2017). Transplantation of wild-type mouse hematopoietic stem and progenitor cells ameliorates deficits in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Sci Transl Med*, 9(413). doi:10.1126/scitranslmed.aaj2347
- Rodriguez, M. C., MacDonald, J. R., Mahoney, D. J., Parise, G., Beal, M. F., & Tarnopolsky, M. A. (2007). Beneficial effects of creatine, CoQ10, and lipoic acid in mitochondrial disorders. *Muscle Nerve*, 35(2), 235-242. doi:10.1002/mus.20688
- Rodríguez-Hernández, A., Cordero, M. D., Salviati, L., Artuch, R., Pineda, M., Briones, P., . . . Sánchez-Alcázar, J. A. (2009). Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy*, 5(1), 19-32.
- Rodríguez-Hidalgo, M., Luna-Sánchez, M., Hidalgo-Gutiérrez, A., Barriocanal-Casado, E., Mascaraque, C., Acuña-Castroviejo, D., . . . López, L. C. (2018). Reduction in the levels of CoQ biosynthetic proteins is related to an increase in lifespan without evidence of

- hepatic mitohormesis. *Sci Rep*, 8(1), 14013. doi:10.1038/s41598-018-32190-y
- Rogers, G. W., Brand, M. D., Petrosyan, S., Ashok, D., Elorza, A. A., Ferrick, D. A., & Murphy, A. N. (2011). High throughput microplate respiratory measurements using minimal quantities of isolated mitochondria. *PLoS One*, 6(7), e21746. doi:10.1371/journal.pone.0021746
- Romero-Moya, D., Bueno, C., Montes, R., Navarro-Montero, O., Iborra, F. J., López, L. C., . . . Menendez, P. (2013). Cord blood-derived CD34+ hematopoietic cells with low mitochondrial mass are enriched in hematopoietic repopulating stem cell function. *Haematologica*, 98(7), 1022-1029. doi:10.3324/haematol.2012.079244
- Rudolph, G., Dimitriadis, K., Büchner, B., Heck, S., Al-Tamami, J., Seidensticker, F., . . . Klopstock, T. (2013). Effects of idebenone on color vision in patients with leber hereditary optic neuropathy. *J Neuroophthalmol*, 33(1), 30-36. doi:10.1097/WNO.0b013e318272c643
- Rutter, J., Winge, D. R., & Schiffman, J. D. (2010). Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion*, 10(4), 393-401. doi:10.1016/j.mito.2010.03.001
- Römisch-Margl, W., Prehn, C., Bogumil, R., Röhring, C., Suhre, K., & Adamski, J. (2012). Procedure for tissue sample preparation and metabolite extraction for high-throughput targeted metabolomics. *Metabolomics*, 8(1), 133-142. doi:10.1007/s11306-011-0293-4
- Sallevelt, S. C., de Die-Smulders, C. E., Hendrickx, A. T., Hellebrekers, D. M., de Coo, I. F., Alston, C. L., . . . Smeets, H. J. (2017). De novo mtDNA point mutations are common and have a low recurrence risk. *J Med Genet*, 54(2), 73-83. doi:10.1136/jmedgenet-2016-103876
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 169(2), 361-371. doi:10.1016/j.cell.2017.03.035
- Schottlaender, L. V., Bettencourt, C., Kiely, A. P., Chalasani, A., Neergheen, V., Holton, J. L., . . . Houlden, H. (2016). Coenzyme Q10 Levels Are Decreased in the Cerebellum of Multiple-System Atrophy Patients. *PLoS One*, 11(2), e0149557. doi:10.1371/journal.pone.0149557
- Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*, 19(8), 1777-1783. doi:10.1093/emboj/19.8.1777
- Sessa, M., Lorioli, L., Fumagalli, F., Acquati, S., Redaelli, D., Baldoli, C., . . . Biffi, A. (2016). Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a

- non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet*, 388(10043), 476-487. doi:10.1016/S0140-6736(16)30374-9
- Siegmund, S. E., Yang, H., Sharma, R., Javors, M., Skinner, O., Mootha, V., . . . Schon, E. A. (2017). Low-dose rapamycin extends lifespan in a mouse model of mtDNA depletion syndrome. *Hum Mol Genet*, 26(23), 4588-4605. doi:10.1093/hmg/ddx341
- Sousa, J. S., D'Imprima, E., & Vonck, J. (2018). Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Subcell Biochem*, 87, 167-227. doi:10.1007/978-981-10-7757-9_7
- Spinazzi, M., Radaelli, E., Horr , K., Arranz, A. M., Goukko, N. V., Agostinis, P., . . . De Strooper, B. (2019). PARL deficiency in mouse causes Complex III defects, coenzyme Q depletion, and Leigh-like syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(1), 277-286. doi:10.1073/pnas.1811938116
- Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. 20(7), 745-754. doi:10.1038/s41556-018-0124-1
- Stefely, J. A., & Pagliarini, D. J. (2017). Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. *Trends Biochem Sci*, 42(10), 824-843. doi:10.1016/j.tibs.2017.06.008
- Stenton, S. L., & Prokisch, H. (2018). Advancing genomic approaches to the molecular diagnosis of mitochondrial disease. *Essays Biochem*, 62(3), 399-408. doi:10.1042/EBC20170110
- Stocker, R., Bowry, V. W., & Frei, B. (1991). Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(5), 1646-1650.
- Stroud, D. A., Surgenor, E. E., Formosa, L. E., Reljic, B., Frazier, A. E., Dibley, M. G., . . . Ryan, M. T. (2016). Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*, 538(7623), 123-126. doi:10.1038/nature19754
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., . . . Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7), 1043-1057. doi:10.1016/j.cell.2005.05.025
- Taivassalo, T., Gardner, J. L., Taylor, R. W., Schaefer, A. M., Newman, J., Barron, M. J., . . . Turnbull, D. M. (2006). Endurance training and detraining in mitochondrial myopathies due to single large-scale mtDNA deletions. *Brain*, 129(Pt 12), 3391-3401. doi:10.1093/brain/awl282
- Taivassalo, T., Shoubridge, E. A., Chen, J., Kennaway, N. G., DiMauro, S., Arnold, D. L., & Haller, R. G. (2001). Aerobic conditioning in

- patients with mitochondrial myopathies: physiological, biochemical, and genetic effects. *Ann Neurol*, 50(2), 133-141.
- Tarnopolsky, M. A. (2014). Exercise as a therapeutic strategy for primary mitochondrial cytopathies. *J Child Neurol*, 29(9), 1225-1234. doi:10.1177/0883073814538512
- Thompson, K., Majd, H., Dallabona, C., Reinson, K., King, M. S., Alston, C. L., . . . Taylor, R. W. (2016). Recurrent De Novo Dominant Mutations in SLC25A4 Cause Severe Early-Onset Mitochondrial Disease and Loss of Mitochondrial DNA Copy Number. *Am J Hum Genet*, 99(6), 1405. doi:10.1016/j.ajhg.2016.11.001
- Tormos, K. V., Anso, E., Hamanaka, R. B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., & Chandel, N. S. (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab*, 14(4), 537-544. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.007
- Torres-Torronteras, J., Cabrera-Pérez, R., Barba, I., Costa, C., de Luna, N., Andreu, A. L., . . . Martí, R. (2016). Long-Term Restoration of Thymidine Phosphorylase Function and Nucleoside Homeostasis Using Hematopoietic Gene Therapy in a Murine Model of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Hum Gene Ther*, 27(9), 656-667. doi:10.1089/hum.2015.160
- Torres-Torronteras, J., Cabrera-Pérez, R., Vila-Julià, F., Viscomi, C., Cámara, Y., Hirano, M., . . . Martí, R. (2018). Long-Term Sustained Effect of Liver-Targeted Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Hum Gene Ther*, 29(6), 708-718. doi:10.1089/hum.2017.133
- Torres-Torronteras, J., Gómez, A., Eixarch, H., Palenzuela, L., Pizzorno, G., Hirano, M., . . . Martí, R. (2011). Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Ther*, 18(8), 795-806. doi:10.1038/gt.2011.24
- Torres-Torronteras, J., Viscomi, C., Cabrera-Pérez, R., Cámara, Y., Di Meo, I., Barquinero, J., . . . Martí, R. (2014). Gene therapy using a liver-targeted AAV vector restores nucleoside and nucleotide homeostasis in a murine model of MNGIE. *Mol Ther*, 22(5), 901-907. doi:10.1038/mt.2014.6
- Tran, U. C., & Clarke, C. F. (2007). Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion*, 7 Suppl, S62-71. doi:10.1016/j.mito.2007.03.007
- Tucker, E. J., Compton, A. G., & Thorburn, D. R. (2010). Recent advances in the genetics of mitochondrial encephalopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 10(4), 277-285. doi:10.1007/s11910-010-0112-8
- Upadhyay, V., Trivedi, V., Shah, G., Yadav, M., & Shrivastav, P. S. (2014). Rapid and sensitive UPLC-MS-MS determination of tacrolimus in

- Wistar rats and human blood. *J Chromatogr Sci*, 52(1), 59-67. doi:10.1093/chromsci/bms205
- Vazquez Fonseca, L., Doimo, M., Calderan, C., Desbats, M. A., Acosta, M. J., Cerqua, C., . . . Salviati, L. (2018). Mutations in COQ8B (ADCK4) found in patients with steroid-resistant nephrotic syndrome alter COQ8B function. *Hum Mutat*, 39(3), 406-414. doi:10.1002/humu.23376
- Viscomi, C., Bottani, E., Civiletto, G., Cerutti, R., Moggio, M., Fagiolari, G., . . . Zeviani, M. (2011). In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 α axis. *Cell Metab*, 14(1), 80-90. doi:10.1016/j.cmet.2011.04.011
- Viscomi, C., Burlina, A. B., Dweikat, I., Savoiaro, M., Lamperti, C., Hildebrandt, T., . . . Zeviani, M. (2010). Combined treatment with oral metronidazole and N-acetylcysteine is effective in ethylmalonic encephalopathy. *Nat Med*, 16(8), 869-871. doi:10.1038/nm.2188
- Visigalli, I., Delai, S., Politi, L. S., Di Domenico, C., Cerri, F., Mrak, E., . . . Biffi, A. (2010). Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood*, 116(24), 5130-5139. doi:10.1182/blood-2010-04-278234
- Voet, N. B., van der Kooi, E. L., Riphagen, I. I., Lindeman, E., van Engelen, B. G., & Geurts, A. C. (2013). Strength training and aerobic exercise training for muscle disease. *Cochrane Database Syst Rev*(7), CD003907. doi:10.1002/14651858.CD003907.pub4
- Walter, L., Miyoshi, H., Leverage, X., Bernard, P., & Fontaine, E. (2002). Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. A progress report. *Free Radic Res*, 36(4), 405-412.
- Walter, L., Nogueira, V., Leverage, X., Heitz, M. P., Bernardi, P., & Fontaine, E. (2000). Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J Biol Chem*, 275(38), 29521-29527. doi:10.1074/jbc.M004128200
- Wang, Y., Oxeer, D., & Hekimi, S. (2015). Mitochondrial function and lifespan of mice with controlled ubiquinone biosynthesis. *Nat Commun*, 6, 6393. doi:10.1038/ncomms7393
- Wilkinson, F. L., Sergijenko, A., Langford-Smith, K. J., Malinowska, M., Wynn, R. F., & Bigger, B. W. (2013). Busulfan conditioning enhances engraftment of hematopoietic donor-derived cells in the brain compared with irradiation. *Mol Ther*, 21(4), 868-876. doi:10.1038/mt.2013.29
- Wong, E. S., McIntyre, C., Peters, H. L., Ranieri, E., Anson, D. S., & Fletcher, J. M. (2014). Correction of methylmalonic aciduria in vivo

- using a codon-optimized lentiviral vector. *Hum Gene Ther*, 25(6), 529-538. doi:10.1089/hum.2013.111
- Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., . . . Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science*, 277(5322), 60-66.
- Yadak, R., Cabrera-Pérez, R., Torres-Torronteras, J., Bugiani, M., Haecck, J. C., Huston, M. W., . . . de Coo, I. F. M. (2018). Preclinical Efficacy and Safety Evaluation of Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in a Mouse Model of MNGIE. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 8, 152-165. doi:10.1016/j.omtm.2018.01.001
- Yang, Y. Y., Vasta, V., Hahn, S., Gangoiti, J. A., Opheim, E., Sedensky, M. M., & Morgan, P. G. (2011). The role of DMQ(9) in the long-lived mutant clk-1. *Mech Ageing Dev*, 132(6-7), 331-339. doi:10.1016/j.mad.2011.06.009
- Yu, A. K., Datta, S., McMackin, M. Z., & Cortopassi, G. A. (2017). Rescue of cell death and inflammation of a mouse model of complex 1-mediated vision loss by repurposed drug molecules. *Hum Mol Genet*, 26(24), 4929-4936. doi:10.1093/hmg/ddx373
- Yubero, D., Montero, R., Martín, M. A., Montoya, J., Ribes, A., Grazina, M., . . . group, C. d. s. (2016). Secondary coenzyme Q10 deficiencies in oxidative phosphorylation (OXPHOS) and non-OXPHOS disorders. *Mitochondrion*, 30, 51-58. doi:10.1016/j.mito.2016.06.007
- Yubero, D., Montero, R., O'Callaghan, M., Pineda, M., Meavilla, S., Delgadillo, V., . . . Artuch, R. (2016). Coenzyme Q. *JIMD Rep*, 25, 1-7. doi:10.1007/8904_2015_421
- Yubero, D., O'Callaghan, M., Montero, R., Ormazabal, A., Armstrong, J., Espinos, C., . . . Artuch, R. (2014). Association between coenzyme Q10 and glucose transporter (GLUT1) deficiency. *BMC Pediatr*, 14, 284. doi:10.1186/s12887-014-0284-5
- Zhang, J., Frerman, F. E., & Kim, J. J. (2006). Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44), 16212-16217. doi:10.1073/pnas.0604567103
- Zhang, X., Chen, S., Song, L., Tang, Y., Shen, Y., Jia, L., & Le, W. (2014). MTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy*, 10(4), 588-602. doi:10.4161/auto.27710
- Zhu, J., Vinothkumar, K. R., & Hirst, J. (2016). Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 536(7616), 354-358. doi:10.1038/nature19095

Eliana Barriocanal Casado

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., & Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol*, 15(9), 871-875. doi:10.1038/nbt0997-871