

ESTUDIOS FISIOPATOLÓGICOS PARA LA  
BÚSQUEDA DE NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS  
EN ACIDEMIA PROPIÓNICA MEDIANTE LA  
CARACTERIZACIÓN DEL MODELO MURINO Y  
EL DESARROLLO DE NUEVOS MODELOS  
CELULARES HUMANOS BASADOS EN iPSCs

**ESMERALDA ALONSO BARROSO**



Tesis doctoral

UAM, 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Doctorado en Biociencias Moleculares

**Estudios fisiopatológicos para la búsqueda de  
nuevas dianas terapéuticas en acidemia  
propiónica mediante la caracterización del  
modelo murino y el desarrollo de nuevos modelos  
celulares humanos basados en iPSCs**

TESIS DOCTORAL

**Esmeralda Alonso Barroso**

Madrid, 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



## **Estudios fisiopatológicos para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en acidemia propiónica mediante la caracterización del modelo murino y el desarrollo de nuevos modelos celulares humanos basados en iPSCs**

Memoria presentada por la graduada en Bioquímica

**Esmeralda Alonso Barroso**

Para optar al grado de doctor en Biociencias Moleculares

en la modalidad de doctorado internacional

Trabajo realizado bajo la supervisión y dirección de:

**Dra. Lourdes Ruiz Desviat**

**Dra. Eva Richard Rodríguez**

Profesores titulares del Departamento de Biología Molecular

Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM) y en una estancia corta en el Lund Stem Cell Center (Lund, Sweden). Este trabajo ha sido posible gracias a una ayuda para la formación del profesorado universitario (FPU15/02923) y a la ayuda a la movilidad para estancias breves y traslados temporales para beneficiarios del programa FPU (EST17/00224).

A mi familia, por acompañarme  
siempre

A Pablito, porque haces que a tu  
lado todo sea más fácil

“Even the smallest person can change the course of the future”

J. R. R. Tolkien

# ÍNDICE



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
<b>1. Acidemia propiónica</b>	<b>17</b>
1.1  Diagnóstico	18
1.2  Presentación clínica	18
1.3  Fisiopatología	19
1.4  Tratamiento	22
1.5  Terapias en investigación	23
1.6  Modelos de enfermedad en AP	24
1.6.1. Modelos animales	24
1.6.2. Modelos celulares	25
<b>2. Modelos de enfermedad basados en células madre</b>	<b>26</b>
<b>3. La mitocondria y sus funciones</b>	<b>28</b>
3.1  Metabolismo energético mitocondrial	28
3.2  Biogénesis mitocondrial	29
3.3  Estrés oxidativo	30
3.4  Muerte celular	32
3.5  Relación entre la mitocondria y el RE	33
<b>4. Autofagia</b>	<b>35</b>
4.1  Papel de mTORC1 y autofagia en el sistema cardiovascular	36
<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
<b>1. Materiales</b>	<b>45</b>
1.1  Líneas celulares	45
1.2  Modelo murino	46
1.3  Reactivos y otros materiales	46
1.4  Anticuerpos	53
1.5  Oligonucleótidos	55

<b>2. Métodos</b>	<b>60</b>
2.1  Cultivos celulares	60
2.1.1. Reprogramación no integrativa de fibroblastos a iPSCs	60
2.1.2. Diferenciación iPSCs a las tres capas germinales	61
2.1.3. Diferenciación iPSCs a iAs	61
2.1.4. Diferenciación iPSCs a iNs	62
2.1.5. Diferenciación iPSCs a iCMs	62
2.2  Técnicas de proteínas	63
2.2.1. Preparación de homogenados para <i>Western Blot</i>	63
2.2.2. <i>Western Blot</i>	63
2.2.3. Detección de proteínas carboniladas en tejido de ratón	64
2.3  Técnicas de ácidos nucleicos	64
2.3.1. Aislamiento de ácidos nucleicos en células y tejidos	64
2.3.2. Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos	65
2.3.3. Amplificación de DNA	65
2.3.4. Secuenciación	66
2.3.5. qRT-PCR	66
2.3.6. Metilación promotores <i>OCT4</i> y <i>NANOG</i>	66
2.3.7. MLPA	67
2.3.8. Cariotipo	67
2.3.9. Análisis de microsatélites	67
2.4  Generación de partículas lentivirales	68
2.5  Tratamiento <i>in vivo</i> con dieta rica en BCAA y treonina	68
2.6  Tratamiento <i>in vivo</i> con rapamicina	68
2.7  Citometría de flujo	69
2.7.1. Cuantificación del nivel de expresión de una proteína	69
2.7.2. Detección de ROS	69
2.8  Microscopía óptica, electrónica y confocal	70
2.8.1. Microscopía óptica	70
2.8.2. Microscopía electrónica	70
2.8.3. Microscopía confocal	71
2.9  Evaluación propiedades electrofisiológicas iNs	72
2.10  Evaluación tasa consumo oxígeno	72
2.10.1. Tasa consumo oxígeno en iCMs	72
2.10.2. Tasa consumo de oxígeno en iAs y iNs	73
2.11  Cuantificación de propionilcarnitina	73
2.12  Análisis estadístico	74



<b>RESULTADOS</b>	<b>77</b>
<b>MODELO MURINO DE AP</b>	
<b>1. Estudio <i>in vivo</i> de vías que contribuyen a la fisiopatología de la AP</b>	<b>77</b>
1.1  Evaluación de la biogénesis mitocondrial	77
1.2  Evaluación de la homeostasis redox	80
1.2.1. Análisis de los niveles de enzimas antioxidantes	80
1.2.2. Análisis del daño oxidativo a proteínas	81
1.3  Evaluación de parámetros relacionados con la muerte celular	81
<b>2. Estudio <i>in vivo</i> del proceso de autofagia y evaluación del efecto del tratamiento con rapamicina</b>	<b>84</b>
2.1  Evaluación del proceso de autofagia	84
2.2  Análisis de la expresión de la familia miR-199	85
2.3  Evaluación del efecto del tratamiento con rapamicina	87
2.3.1. Análisis de los niveles de proteínas implicadas en autofagia y en la vía de mTORC1	87
2.3.2. Análisis de la expresión de marcadores de daño cardíaco	89
<b>3. Estudio <i>in vivo</i> del efecto de una dieta rica en BCAA y treonina</b>	<b>91</b>
3.1  Evaluación de la homeostasis redox	91
3.2  Análisis de los niveles de proteínas de los complejos de la CTE	93
<b>MODELOS CELULARES DE AP</b>	
<b>1. Generación de nuevos modelos celulares basados en la reprogramación de fibroblastos a iPSCs</b>	<b>95</b>
1.1  Reprogramación de fibroblastos PCCA a iPSCs	95
1.2  Caracterización iPSCs PCCA	96
1.2.1. Determinación de la estabilidad genética y genómica	96
1.2.2. Determinación de la eliminación del virus Sendai	97
1.2.3. Determinación de la pluripotencia	98
1.2.4. Determinación de la capacidad de diferenciación <i>in vitro</i>	100
1.3  Reprogramación de fibroblastos PCCB a iPSCs	101
1.4  Caracterización iPSCs PCCB	101
1.4.1. Determinación de la estabilidad genética y genómica	101
1.4.2. Determinación de la eliminación del virus Sendai	102
1.4.3. Determinación de la pluripotencia	102
1.4.4. Determinación de la capacidad de diferenciación <i>in vitro</i>	103
<b>2. Generación de nuevos modelos celulares basados en la diferenciación de iPSCs a iAs y iNs</b>	<b>105</b>
2.1  Diferenciación de iPSCs Control y PCCA a iAs y iNs	105
2.2  Caracterización de los iAs y iNs generados	106

2.3  Caracterización de la fisiopatología de los iAs y iNs generados	108
2.3.1. Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno	108
2.3.2. Evaluación de las PSCs GABAérgicas	110
<b>3. Generación de nuevos modelos celulares basados en la diferenciación de iPSCs a iCMs</b>	<b>113</b>
3.1  Diferenciación de iPSCs Control, PCCA y PCCB a iCMs	113
3.2  Caracterización de los iCMs generados	114
3.3  Caracterización de la fisiopatología de los iCMs PCCA	116
3.3.1. Evaluación de la función mitocondrial	116
3.3.2. Evaluación de la homeostasis redox	120
3.3.3. Evaluación del proceso de autofagia	122
3.3.4. Evaluación de la biogénesis ribosomal	123
3.3.5. Evaluación de la relación entre la mitocondria y el RE	124
3.3.6. Análisis de la expresión de miRNAs y marcadores de daño cardíaco	126
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>129</b>
<b>1. Estudio de vías que contribuyen a la fisiopatología de AP en el modelo murino hipomorfo</b>	<b>129</b>
<b>2. Generación y caracterización de nuevos modelos celulares basados en iPSCs para el estudio de la AP</b>	<b>136</b>
2.1  Generación de iAs y iNs para el estudio de las alteraciones neurológicas en la AP	137
2.2  Generación de iCMs para el estudio de las alteraciones cardíacas en la AP	140
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>147</b>
<b>CONCLUSIONS</b>	<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>155</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>177</b>

# ABREVIATURAS



**4EBP1:** Proteína de unión al factor de iniciación de la traducción 4B

**ACADM:** Acil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena media

**ACADVL:** Acil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena muy larga

**AFP:**  $\alpha$ -1-fetoproteína

**AMPK:** Quinasa activada por AMP

**ANP/Nppa:** Factor natriurético A

**AP:** Acidemia propiónica

**Atg:** Proteínas iniciadoras de la autofagia

**ATP5G:** Subunidad c de la ATP sintasa

**BCAA:** Aminoácidos ramificados

**BNP/Nppb:** Factor natriurético B

**CaMK:** Calmodulina quinasa dependiente de calcio

**CaN:** Calcineurina

**Casp:** Caspasa

**CAT:** Catalasa

**CD36:** Clúster de diferenciación 36

**CPT:** Carnitina palmitoiltransferasa

**CTE:** Cadena de transporte de electrones

**cTNT:** Troponina T cardíaca

**Cx43:** Conexina 43

**CypD:** Ciclofilina D

**DCM:** Cardiomiopatía dilatada

**DNPH:** 2,4-dinitrofenilhidrazona

**EBS:** Cuerpos embrionarios

**EMHs:** Enfermedades metabólicas hereditarias

**ERR $\alpha$ :** Receptor de estrógenos  $\alpha$

**FAL:** Faloidina

**FBL:** Metiltransferasa fibrilarina

**GAD:** GABA transaminasa

**GCS:** Complejo de degradación de la glicina

**GDH:** Glutamato deshidrogenasa

**GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial

**GLAST:** Transportador de glutamato/aspartato

**GPx:** Glutación peroxidasa

**GSK3 $\beta$ :** Glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**HCM:** Cardiomiopatía hipertrófica

**HO $\cdot$ :** Radical hidroxilo

**iAs:** Astrocitos inducidos

<b>iCMs:</b> Cardiomiocitos inducidos	<b>OLCFAs:</b> Ácidos grasos largos de cadena impar
<b>I<sub>ks</sub>:</b> Corriente rectificadora de potasio de componente lenta	<b>OCR:</b> Tasa consumo de oxígeno
<b>iNs:</b> Neuronas inducidas	<b>OGG1:</b> 8-oxoguanina DNA glicosilasa
<b>iPSCs:</b> Células madre pluripotentes inducidas	<b>PCC:</b> Propionil-CoA carboxilasa
<b>LC3B:</b> Proteína asociada a microtúbulos 1A/1B de cadena ligera 3B	<b>PDH:</b> Piruvato deshidrogenasa
<b>MAMs:</b> Membranas asociadas a las mitocondrias	<b>POLR1A:</b> Subunidad A de la polimerasa I
<b>MAP2:</b> Proteína asociada a microtúbulos 2	<b>PPARs:</b> Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
<b>MAPK:</b> Proteínas quinasas activadas por mitógenos	<b>PRX:</b> Peroxirredoxinas
<b>MFN2:</b> Mitofusina 2	<b>PSCs:</b> Corrientes postsinápticas
<b>miRNAs:</b> microRNAs	<b>qRT-PCR:</b> PCR cuantitativa
<b>MLPA:</b> Técnica de amplificación de múltiples sondas dependientes de ligación	<b>RE:</b> Retículo endoplásmico
<b>MOMP:</b> Permeabilización de la membrana externa mitocondrial	<b>ROS:</b> Especies reactivas de oxígeno
<b>MPTP:</b> Poro de transición mitocondrial	<b>RQ:</b> cantidad relativa
<b>mtDNA:</b> DNA mitocondrial	<b>RRN3:</b> Factor de transcripción de la polimerasa I
<b>NAGS:</b> N-acetil glutamato sintasa	<b>RS:</b> Retículo sarcoplásmico
<b>NCL:</b> Nucleolina	<b>S100β:</b> Proteína de unión a calcio
<b>NRFs:</b> Factores respiratorios nucleares	<b>S6K:</b> Proteína ribosomal S6 quinasa
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:</b> Anión superóxido	<b>SCS:</b> Succinil-CoA sintetasa
	<b>SIG-1R:</b> Receptor δ-1
	<b>SIRT1:</b> Sirtuina 1

**SIRT7:** Sirtuina 7

**SMA:**  $\alpha$ -actina de músculo liso

**SOD:** Superóxido dismutasa

**STRs:** Microsatélites

**TFAM:** Factor de transcripción  
mitocondrial A

**TUB:**  $\beta$ -III-tubulina Tuj1

**UBTF:** Factor 1 de la transcripción  
nucleolar

**UPR:** Respuesta a proteínas mal plegadas

**VIM:** Vimentina

**$\alpha$ -ACT:**  $\alpha$ -actinina

**$\alpha$ CGDH:**  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa

**$\alpha$ -MHC/Myh6:** Isoforma  $\alpha$  de la cadena  
pesada de la miosina

**$\beta$ -MHC/Myh7:** Isoforma  $\beta$  de la cadena  
pesada de la miosina

# RESUMEN



La acidemia propiónica (AP) es una enfermedad neurometabólica hereditaria causada por defectos en los genes *PCCA* y *PCCB* que codifican, respectivamente, para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima mitocondrial propionil-CoA carboxilasa (PCC). La AP suele presentarse de forma neonatal severa, aunque hay presentaciones más tardías y con un fenotipo más suave. Las complicaciones a largo plazo más frecuentes son las relacionadas con los sistemas neurológico, principalmente en el estriado, y cardiovascular, especialmente hipertrofia cardíaca, cardiomiopatía dilatada y arritmias. Actualmente, no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de estas alteraciones y aún no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad.

Estudios previos han mostrado la implicación de la disfunción mitocondrial y la alteración de la homeostasis redox en el desarrollo de la AP, tanto en muestras de pacientes como en el modelo murino hipomorfo *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T). Los estudios realizados en este trabajo para completar la caracterización del modelo murino de AP han puesto de manifiesto la desregulación de la biogénesis mitocondrial y los procesos de muerte celular y la alteración de la expresión de enzimas antioxidantes de forma tejido-específica. Además, se ha observado una alteración en el proceso autofágico, y en algunas de sus vías reguladoras, que podría representar uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de las complicaciones cardíacas en el modelo murino de AP. La evaluación del tratamiento con rapamicina ha mostrado efectos beneficiosos restaurando la autofagia, lo que pone de manifiesto la importancia de la investigación de este compuesto, o sus derivados, como terapia adyuvante en pacientes AP que presenten cardiomiopatías.

Por otro lado, la necesidad de obtener nuevos modelos celulares humanos que nos permitan estudiar en mayor profundidad la fisiopatología de la AP y evaluar el efecto de nuevos compuestos terapéuticos nos ha llevado a la generación y caracterización de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) a partir de fibroblastos de un paciente con mutaciones en el gen *PCCA* y otro, en *PCCB*. Estas líneas de iPSCs han supuesto una herramienta con un gran potencial para modelar la enfermedad ya que se han diferenciado a neuronas (iNs) GABAérgicas, astrocitos (iAs) y cardiomiocitos (iCMs) inducidos. Estudios preliminares han mostrado que las iNs *PCCA* poseen, aparentemente, una menor capacidad de formación de sinapsis que se correlaciona con defectos en el metabolismo energético mitocondrial. Asimismo, la caracterización de los iCMs *PCCA* ha revelado una disminución del metabolismo energético mitocondrial que se relaciona con una alteración en la expresión de genes de la cadena de transporte de electrones y de la biogénesis mitocondrial. Además, presentan alteraciones en la biogénesis ribosomal, en la composición y la respuesta a estrés del retículo endoplásmico y en la expresión de microRNAs relacionados con daño cardíaco. Estas vías alteradas, que pueden contribuir a la fisiopatología de la enfermedad, suponen un punto de partida para la identificación de nuevas dianas terapéuticas en la AP.



# SUMMARY



Propionic acidemia (PA) is an inherited neurometabolic disease caused by defects in the  $\alpha$  or  $\beta$  subunits of the mitochondrial enzyme propionyl-CoA carboxylase (PCC), encoded by *PCCA* or *PCCB* genes, respectively. PA is usually presented as a neonatal form but there are other milder forms that appear later. The most common long-term alterations are those related with the neurological system, in particular the striatum, and the cardiovascular system, especially cardiac hypertrophy, dilated cardiomyopathy and arrhythmias. Currently, the molecular mechanisms underlying disease progression are not yet fully understood and there is no effective treatment for this disease.

Previous studies have shown the involvement of mitochondrial dysfunction and alteration of redox homeostasis in PA development, both in patient samples' and in the hypomorphic murine model *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T). The analyses performed in this work to complete the characterization of the murine model have revealed a deregulation of mitochondrial biogenesis and cell-death processes and altered expression of antioxidant enzymes in a tissue-dependent manner. Moreover, we have observed an alteration in the autophagy process, along with changes in some of its regulatory pathways, which may be considered as one of the mechanisms involved in the development of cardiac alterations in the PA murine model. Rapamycin treatment has proven to be effective in the restoration of the autophagy process reflecting the potential utility of this compound, or its derivatives, as an adjuvant therapy for PA patients presenting cardiomyopathies.

On the other hand, the need to obtain new human cellular models to gain a deeper insight into PA pathophysiology and for the evaluation of new therapeutic compounds has led us to generate and characterize induced pluripotent stem cells (iPSCs). In this work, we have reprogrammed fibroblasts from two PA patients with mutations in either *PCCA* or *PCCB* genes. These iPSCs lines have great potential for disease modelling as they have been successfully differentiated to induced GABAergic neurons (iNs), astrocytes (iAs) and cardiomyocytes (iCMs). Preliminary results have shown that *PCCA* iNs have, apparently, less capacity of synapse formation correlating with defects in mitochondrial energy metabolism. Likewise, characterization of *PCCA* iCMs has revealed an impaired mitochondrial energy metabolism probably due to changes in the expression of genes implicated in the mitochondrial biogenesis process and electron transport chain genes. Moreover, they present alterations in ribosomal biogenesis, in the composition and in the stress response of endoplasmic reticulum and in the expression of some microRNAs related to cardiac damage. The discovery of these altered pathways, which could be involved in PA pathophysiology, could pave the way for the discovery of new therapeutic targets in this disease.

# INTRODUCCIÓN



---

# Introducción

---

## 1. Acidemia propiónica

Las enfermedades metabólicas hereditarias (EMHs), también conocidas como errores innatos del metabolismo, son enfermedades genéticas causadas por defectos en genes que codifican enzimas, cofactores, transportadores, factores de transcripción, etc., que participan en procesos bioquímicos y afectan al metabolismo de moléculas orgánicas, al funcionamiento de orgánulos y a la homeostasis celular. De manera individual, las EMHs son clasificadas como enfermedades raras ya que tienen una incidencia menor a 1 de cada 2.000 nacimientos (Agana *et al.*, 2018).

Las acidemias orgánicas son un grupo de EMHs que se caracterizan por la acumulación de compuestos tóxicos debido al bloqueo de una ruta metabólica. La acidemia propiónica (AP, OMIM 606054), objeto de estudio de este trabajo, es una de las acidemias orgánicas más frecuentes, con una incidencia en la población caucásica de 1 por cada 100.000 nacimientos. En poblaciones con alta consanguinidad la frecuencia puede ser aún mayor, hasta 1 por cada 20.000 nacimientos (Richard *et al.*, 2018).

La AP es una EMH con herencia autosómica recesiva causada por la deficiencia en la enzima mitocondrial dependiente de biotina propionil-CoA carboxilasa (PCC, EC 6.4.1.3). La PCC se encuentra estructurada en forma de heterododecámero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\alpha\beta\beta$ ) codificadas por los genes *PCCA* (OMIM 232000) y *PCCB* (OMIM 232050), respectivamente. Es la enzima encargada de catalizar el primer paso de la carboxilación del propionil-CoA a D-metilmalonil-CoA que, posteriormente, entra en el ciclo de Krebs en forma de succinil-CoA (Wongkittichote *et al.*, 2017). El propionil-CoA puede provenir de las vías de degradación de los aminoácidos metionina y treonina y de los aminoácidos ramificados (BCAA) valina e isoleucina, así como de los ácidos grasos largos de cadena impar (OLCFAs) y las cadenas laterales del colesterol. Además, algunas bacterias

presentes en la flora intestinal también son consideradas una fuente importante de propionato (Richard *et al.*, 2018).

## 1.1| Diagnóstico

El diagnóstico de la AP se lleva a cabo bioquímicamente mediante la detección por espectrometría de masas de metabolitos derivados del propionato como el 3-hidroxi propionato, el 2-metilcitrato y la propionilglicina, que son excretados por la orina. El diagnóstico presintomático de recién nacidos se lleva cabo por la detección en sangre de la acumulación de propionilcarnitina y de una deficiencia secundaria de carnitina por espectrometría de masas en tándem (Imperlini *et al.*, 2016). La confirmación del defecto es llevada a cabo mediante el análisis enzimático por la determinación de la actividad PCC en linfocitos o fibroblastos del paciente y, también, mediante el análisis genético. En casos en los que exista alto riesgo de padecer la enfermedad es posible hacer un diagnóstico prenatal a través de un estudio metabólico, enzimático y genético de muestras fetales (Fraser y Venditti, 2016).

## 1.2| Presentación clínica

La AP se presenta mayoritariamente de forma neonatal en niños asintomáticos al nacer que desarrollan síntomas como rechazo al alimento, vómitos, letargia y fatiga en las primeras semanas de vida. Suele acompañarse de cetoacidosis, hipoglicemia e hiperamonemia. Si no se diagnostica y trata rápidamente estos pacientes desarrollan convulsiones y encefalopatías que pueden llevar al coma y a la muerte. La forma tardía de la enfermedad es menos frecuente y los pacientes suelen presentar retraso en el desarrollo, vómitos crónicos, intolerancia a las proteínas, hipotonía, etc., cuya severidad depende, en parte, del grado de actividad residual de la enzima y la frecuencia de aparición de factores que induzcan un estado catabólico (Pena *et al.*, 2012, Jurecki *et al.*, 2019).

Pese a tener un buen control metabólico, los pacientes AP desarrollan una serie de complicaciones a largo plazo que afectan a los sistemas gastrointestinal, inmunológico, neurológico y cardíaco; siendo estas dos últimas las responsables del mayor porcentaje de morbilidad y mortalidad en la AP (Haijes *et al.*, 2019a). Aproximadamente, el 70% de los pacientes AP desarrollan alteraciones neurológicas a largo plazo como retraso intelectual y psicomotor, hipotonía, convulsiones, atrofia del nervio óptico y desórdenes del movimiento (Tuncel *et al.*, 2018). También se han descrito problemas psiquiátricos como autismo y el trastorno de déficit de atención e hiperactividad (Cotrina *et al.*, 2019). Los estudios de resonancia magnética han permitido identificar lesiones en los ganglios basales, especialmente en las estructuras del estriado núcleo caudado y putamen, que son las responsables de los desórdenes del movimiento. Además, se han identificado otros daños como menor mielinización en la materia blanca, edemas cerebrales, atrofia cortical generalizada y

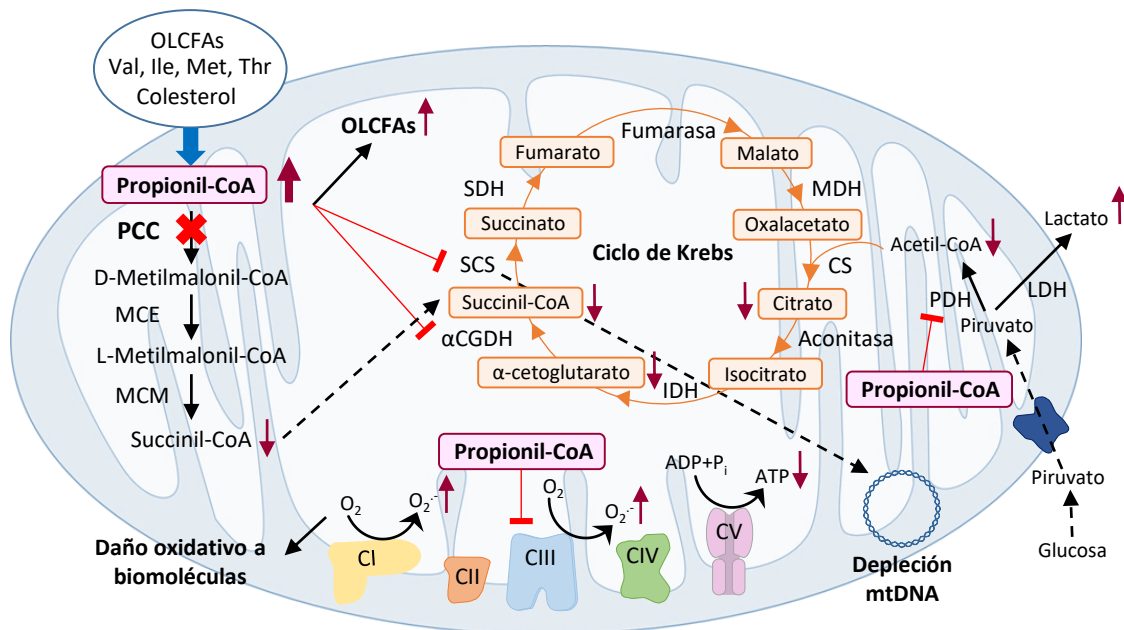
hemorragia cerebelar. Los pacientes que no siguen la dieta prescrita correctamente y que sufren un gran número de crisis metabólicas tienen un mayor riesgo de desarrollo de patologías neurológicas graves, posiblemente debido a la intoxicación crónica causada por la acumulación de metabolitos tóxicos (Wajner, 2019).

Otras de las complicaciones más habituales e importantes, como se ha indicado anteriormente, son las que afectan al corazón. Los síntomas cardíacos no están relacionados con la severidad de la enfermedad y pueden aparecer incluso cuando no se han sufrido descompensaciones metabólicas por un largo período de tiempo. Las más frecuentes son las cardiomiopatías, especialmente la cardiomiopatía hipertrófica (HCM) y la cardiomiopatía dilatada (DCM), la disfunción cardíaca aguda y el síndrome del QT largo, que es causante de las arritmias ventriculares. La DCM está caracterizada por un aumento del tamaño de los ventrículos y disfunción sistólica y se observa en un 30% de los pacientes AP (Kovacevic *et al.*, 2020). Normalmente, se presenta en el primer año de vida, aunque se han descrito casos más leves y con cierta actividad residual PCC en los que se ha desarrollado durante la edad adulta (Grotto *et al.*, 2018, Hannah *et al.*, 2019). El intervalo QT refleja la duración desde que se inicia la despolarización ventricular hasta el final de su repolarización (Bohnen *et al.*, 2017). La prolongación de este intervalo ha sido reportada en el 70% de pacientes AP, mientras que las arritmias, como latidos ventriculares ectópicos o pareados, en un 20%. Frecuentemente, aparecen una vez pasada la infancia y su prevalencia aumenta con la edad, sugiriendo una alteración de las corrientes de repolarización debida al efecto acumulativo de los productos tóxicos (Bodi *et al.*, 2016).

### 1.3| Fisiopatología

Como sucede en muchas de las acidurias orgánicas (Dimitrov *et al.*, 2020), en la AP la acumulación de metabolitos tóxicos derivados de la deficiencia en PCC produce una serie de alteraciones sobre el metabolismo energético y la homeostasis redox que derivan en una disfunción mitocondrial secundaria (Richard *et al.*, 2018). Se ha descrito que la acumulación de propionil-CoA produce inhibición de las enzimas del ciclo de Krebs  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa ( $\alpha$ CGDH) y succinil-CoA sintetasa (SCS). Sus rutas anapleróticas también se ven afectadas ya que el propionil-CoA es capaz de inhibir la piruvato deshidrogenasa (PDH) cuyo producto puede entrar al ciclo de Krebs para compensar la falta de sustratos. De la misma manera se ve afectada la ruta anaplerótica del succinil-CoA ya que el producto de la reacción mediada por la PCC, el D-metilmalonil-CoA, también puede entrar al ciclo de Krebs en forma de succinil-CoA (Wongkittichote *et al.*, 2017). Estas alteraciones no son debidas exclusivamente a la acción del propionil-CoA, sino que también son causadas por la acumulación de otros productos tóxicos derivados de su metabolismo, como el metilcitrato, que se produce por conjugación con el oxalacetato y produce inhibición de enzimas del ciclo de Krebs (Haijes *et al.*, 2019b) (**Figura 1**).

La deficiencia energética observada en la AP también es debida a la disminución de la expresión y actividad de complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE), como la inhibición de la actividad del complejo CIII por parte del propionil-CoA que se ha observado en tejidos de pacientes (Mardach *et al.*, 2005, Schwab *et al.*, 2006, de Keyzer *et al.*, 2009), lo cual conlleva una reducción de la producción de ATP (Wongkittichote *et al.*, 2017). Alteraciones en la CTE suelen estar asociadas a una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Pizzino *et al.*, 2017). En este sentido, se ha descrito un aumento de ROS y de daño oxidativo a lípidos y proteínas en muestras de pacientes (Mc Guire *et al.*, 2009, Ribas *et al.*, 2012, Gallego-Villar *et al.*, 2013). Además, esta alteración de la homeostasis redox podría ser responsable de las alteraciones ultraestructurales encontradas en mitocondrias de pacientes AP (Schwab *et al.*, 2006, Baruteau *et al.*, 2014). Por otro lado, en algunas muestras de tejido de pacientes se ha observado una depleción de DNA mitocondrial (mtDNA) que podría contribuir a la deficiencia energética y que puede ser debida a la inhibición de la SCS, que es una enzima que participa indirectamente en la síntesis del mtDNA, por parte del propionil-CoA (Yano *et al.*, 2003, Schwab *et al.*, 2006, de Keyzer *et al.*, 2009). Además, se produce una acumulación de OLCFAs debido a que la PCC participa en el proceso de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y, por otro lado, la síntesis de ácidos grasos se encuentra favorecida ya que el propionil-CoA actúa como sustrato (Wongkittichote *et al.*, 2017) (Figura 1).

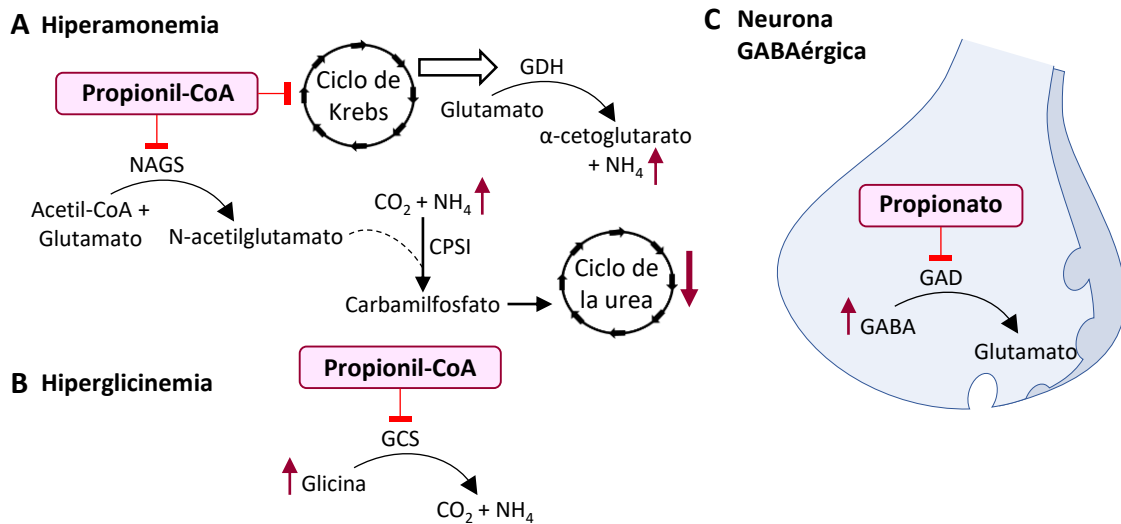


**Figura 1. Efecto de la acumulación del propionil-CoA sobre el metabolismo energético mitocondrial.** Esquema que muestra los distintos precursores del propionil-CoA y su metabolismo en la mitocondria. La deficiencia en PCC provoca una acumulación de propionil-CoA que inhibe la función de distintas enzimas generando un defecto en el metabolismo energético, depleción del mtDNA y acumulación de ROS que produce daño oxidativo en biomoléculas, de forma que se produce una disfunción mitocondrial que podría contribuir a la fisiopatología de la AP. CI: NADH deshidrogenasa; CII: succinato deshidrogenasa; CIII: complejo citocromo b-c1; CIV: citocromo oxidasa; CV: H<sup>+</sup>-ATP sintasa; CS: citrato sintasa; IDH: isocitrato deshidrogenasa; Ile: isoleucina; LDH: lactato deshidrogenasa; MCE: metilmalonil-CoA epimerasa; MCM: metilmalonil-CoA mutasa; MDH: malato deshidrogenasa; Met: metionina; mtDNA: DNA mitocondrial; OLCFAs: ácidos grasos largos de cadena impar; PCC: propionil-CoA carboxilasa; PDH: piruvato deshidrogenasa; SCS: succinil-CoA sintetasa; SDH: succinato deshidrogenasa; Thr: treonina; Val: valina;  $\alpha$ CGDH:  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa.

La acumulación de productos tóxicos y la inhibición del metabolismo energético es especialmente relevante en tejidos con una alta demanda energética, como son el corazón y el cerebro (Haijes *et al.*, 2019a). Aunque aún no se conocen los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de las cardiomiopatías, hay varias hipótesis sobre su causa: i) la acumulación de productos tóxicos derivados del metabolismo del propionato produce un bloqueo de la corriente rectificadora de potasio de componente lenta ( $I_{Ks}$ ) y una disminución de la expresión del canal de potasio KCNQ1; esto se traduce en una prolongación de la duración del potencial de acción que podría dar lugar a la aparición del síndrome del QT largo y arritmias (Bodi *et al.*, 2016); ii) una deficiencia secundaria de carnitina (Mardach *et al.*, 2005), molécula clave para el correcto funcionamiento cardíaco, y de la coenzima Q<sub>10</sub>, que tiene función antioxidante (Fragaki *et al.*, 2011, Baruteau *et al.*, 2014); iii) bloqueo de las rutas anapleróticas del ciclo de Krebs y aumento del estrés oxidativo por la deficiencia en PCC generando una depleción del metabolismo energético que puede ser una de las causas de las alteraciones en la contractilidad del corazón (Mardach *et al.*, 2005, Fragaki *et al.*, 2011, Baruteau *et al.*, 2014, Wongkittichote *et al.*, 2017); y iv) la inhibición de las deacetilasas de histonas por parte del propionato (Silva *et al.*, 2018) que podría estar implicada en la aparición del remodelado cardíaco patológico (Bagchi y Weeks, 2019).

Se postula que en el cerebro es igualmente relevante el defecto del metabolismo energético y, junto al aumento del estrés oxidativo, producen un desbalance en los niveles de metabolitos esenciales y neurotransmisores afectando a su correcto funcionamiento (Haijes *et al.*, 2019a). Una de las alteraciones más frecuentes es la hiperamonemia que está asociada a la aparición de edemas cerebrales debido a la alta susceptibilidad de los astrocitos al estrés osmótico y con un aumento del estrés oxidativo, alteraciones en la transmisión sináptica e inflamación (Heidari, 2019). La acumulación de amonio puede estar causada por defectos en el ciclo de la urea ya que el propionil-CoA actúa como inhibidor competitivo de la N-acetilglutamato sintasa (NAGS), enzima encargada de la síntesis del activador del ciclo de la urea N-acetilglutamato. Otro motivo podría ser el bloqueo del ciclo de Krebs y de sus rutas anapleróticas lo que favorece el desbalance de algunas enzimas, como la glutamato deshidrogenasa (GDH), hacia la producción de amonio (Haberle *et al.*, 2018). Además de la intoxicación por amonio, la hiperamonemia puede derivar en una sobreactivación de los receptores NMDA por aumento del glutamato extracelular lo que podría dar lugar a la aparición de epilepsia (Barker-Haliski y White, 2015), como sucede en un modelo de ratas tratadas con ácido propiónico (Rigo *et al.*, 2006). Esta sobreactivación se ve reforzada por el aumento de los niveles de glicina debido a la inhibición del propionil-CoA sobre el complejo encargado de su degradación (GCS) (Wongkittichote *et al.*, 2017). Por último, se ha descrito que la letargia observada en un modelo murino tratado con propionato podría deberse a un aumento del GABA extracelular debido a la inhibición por parte del propionato de la GABA transaminasa (GAD), enzima encargada de su degradación (Morland *et al.*, 2018) (**Figura 2**).





**Figura 2. Mecanismos moleculares implicados en las alteraciones neurológicas de la AP.** Hiperamonemia producida por acumulación del propionil-CoA que produce inhibición de enzimas del ciclo de Krebs y de la NAGS (**panel A**). Hiperглицинемия causada por inhibición de la GCS por parte del propionil-CoA (**panel B**). Acumulación del neurotransmisor GABA en neuronas GABAérgicas por el efecto inhibitorio del propionato sobre la GAD (**panel C**). CPSI: carbamil fosfato sintasa I; GAD: GABA transaminasa; GCS: complejo de degradación de la glicina; GDH: glutamato deshidrogenasa; NAGS: N-acetilglutamato sintasa.

### 1.4| Tratamiento

Actualmente, no existe cura para la AP, por lo que el tratamiento de la enfermedad se basa en una corrección metabólica que alivie la sintomatología y mejore la calidad de vida de los pacientes.

El tratamiento a largo plazo está fundamentalmente basado en una dieta restringida en proteínas y suplementada con una mezcla de aminoácidos exenta de los aminoácidos propionogénicos, en evitar estados de ayuno que fomenten el catabolismo de proteínas y en un tratamiento con antibióticos para evitar la producción de propionato por parte de la flora intestinal. Esta dieta suele suplementarse con L-carnitina, para corregir los bajos niveles de carnitina libre y promover la excreción de metabolitos tóxicos. Durante las crisis agudas, la hiperamonemia puede ser tratada con N-carbamilglutamato para estimular el ciclo de la urea o benzoato de sodio y sesiones de hemodiálisis o hemofiltración en los casos más agudos; la cetoacidosis es tratada mediante bicarbonato sódico (Hajjes *et al.*, 2019b).

El trasplante hepático también es usado como otra posible estrategia terapéutica, ya que el hígado es el principal órgano metabolizador de BCAA. Tras el trasplante, los estudios muestran una reversión de la enfermedad hacía un fenotipo menos severo en el que se reduce la aparición de crisis metabólicas agudas y mejora la tolerancia a las proteínas. Además, se ha observado que, en aproximadamente la mitad de los pacientes trasplantados, se produce una reversión de la cardiomiopatía y, en algunos casos, también mejora la sintomatología neurológica. Sin embargo, el

alto coste económico y las complicaciones derivadas del propio trasplante hacen que no sea la terapia más adecuada en todos los casos (Yap *et al.*, 2020).

## 1.5 | Terapias en investigación

La inefectividad de estos tratamientos para prevenir el desarrollo a largo plazo de otras complicaciones y la baja calidad de vida de los pacientes pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas aproximaciones terapéuticas, como las siguientes que se encuentran en investigación:

Terapia génica: el defecto en PCC se ha intentado revertir mediante terapia génica y para ello ha sido clave el desarrollo de un modelo murino hipomorfo *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T) (Guenzel *et al.*, 2013). En este modelo, se ha conseguido recuperar a largo plazo cierto nivel de actividad PCC mediante la inyección intravenosa de vectores adenoasociados con alto tropismo muscular y hepático, logrando una reducción en los niveles de metabolitos tóxicos acumulados (Guenzel *et al.*, 2015).

Tratamiento antioxidante: se ha descrito una reversión del aumento de los niveles de ROS y de la alteración de los niveles de enzimas antioxidantes en fibroblastos de pacientes AP tras el tratamiento con compuestos antioxidantes como tirón, trolox, resveratrol y MitoQ (Gallego-Villar *et al.*, 2014). Estos resultados han sido confirmados posteriormente en el modelo murino hipomorfo, donde se ha observado que el tratamiento con MitoQ o resveratrol produce una disminución del daño oxidativo en biomoléculas, alteración en la expresión de enzimas antioxidantes y reversión de marcadores de daño cardíaco (Rivera-Barahona *et al.*, 2017a). Asimismo, se ha descrito la reversión de la cardiomiopatía de un paciente AP mediante la suplementación con la coenzima Q<sub>10</sub> (Baruteau *et al.*, 2014) y una mejora de las funciones cognitivas de ratas tras la administración de ácido propiónico y el posterior tratamiento con el compuesto antioxidante ácido ascórbico (Pettenuzzo *et al.*, 2002).

Terapia de remplazo enzimático: algunos estudios *in vitro* preliminares muestran la capacidad de restauración de la actividad PCC mediante la introducción de la enzima PCC usando péptidos de fusión para favorecer su entrada a las mitocondrias (Darvish-Damavandi *et al.*, 2016, Collard *et al.*, 2018).

Terapia anaplerótica: la suplementación con metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs, especialmente el citrato, supone una forma segura de restaurar el metabolismo energético y ha conseguido reducir el número de hospitalizaciones en pacientes AP (Longo *et al.*, 2017).

Terapias específicas de mutación: se han desarrollado distintas aproximaciones terapéuticas dirigidas a corregir un defecto genético específico. Las mutaciones *missense* son las más frecuentes en la AP y, generalmente, afectan al plegamiento de la proteína. Se ha descrito el efecto de chaperonas farmacológicas que estabilizan la proteína PCC aumentando su actividad *in vitro* (Kelson *et al.*, 1996). Por otro lado, el uso de oligonucleótidos antisentido y la sobreexpresión del U1 snRNA

en fibroblastos de pacientes ha corregido el efecto de mutaciones de *splicing* (Rincon *et al.*, 2007, Sanchez-Alcudia *et al.*, 2011). Las mutaciones *nonsense* podrían ser revertidas mediante el uso de compuestos *readthrough* que son capaces de recuperar cierta actividad enzimática ya que evitan la terminación temprana de la traducción de la proteína (Sanchez-Alcudia *et al.*, 2012).

## 1.6| Modelos de enfermedad en AP

Comprender los mecanismos celulares y moleculares que ocurren en las acidurias orgánicas es esencial para la investigación de nuevas estrategias que permitan su prevención y tratamiento y, para ello, es necesaria la búsqueda de nuevos modelos animales y celulares que recapitulen fielmente las características de la enfermedad (Dimitrov *et al.*, 2020).

### 1.6.1. Modelos animales

La búsqueda de modelos que permitan un estudio a un nivel más fisiológico de los procesos alterados en la AP y el efecto de nuevas aproximaciones terapéuticas ha llevado al desarrollo de dos modelos murinos. El primero de ellos, se trata de un ratón *knockout* deficiente en PCC con una presentación neonatal severa de la enfermedad que solo le permite sobrevivir 24-36 horas (Miyazaki *et al.*, 2001) lo que impide su uso en investigación. El segundo modelo, se trata de un ratón hipomorfo *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T) basado en el ratón deficiente en PCC al que se le introduce el cDNA del gen *PCCA* humano con la mutación p.A138T, descrita previamente en pacientes AP (Desviat *et al.*, 2004). Este nuevo modelo presenta una forma moderada de la enfermedad ya que retiene el 2,2% de la actividad PCC lo que le permite sobrevivir a la edad adulta mimetizando los síntomas bioquímicos y clínicos de los pacientes (Guenzel *et al.*, 2013), por lo que ha sido el modelo utilizado en todos los estudios posteriores.

El análisis del metabolismo energético en el modelo murino hipomorfo de AP ha mostrado alteraciones en los niveles de proteínas implicadas en glicolisis,  $\beta$ -oxidación y complejos de la CTE de forma tejido-específica. También se ha descrito una alteración de la homeostasis redox marcada por un aumento de los niveles de ROS, desregulación de la expresión de enzimas antioxidantes, depleción de mtDNA y aparición de daño oxidativo en biomoléculas (Gallego-Villar *et al.*, 2013). Además, ha resultado ser un buen modelo para el estudio de las patologías cardíacas asociadas a la AP ya que presenta un aumento de la expresión de marcadores de daño cardíaco como son el factor natriurético A (ANP; *Nppa*), el factor natriurético B (BNP; *Nppb*) y la isoforma  $\beta$  de la cadena pesada de la miosina ( $\beta$ -MHC; *Myh7*) (Rivera-Barahona *et al.*, 2017b). Recientemente, se ha descrito que estos ratones poseen una disfunción cardíaca asociada a una disminución del acoplamiento excitación-contracción por la alteración de las corrientes de calcio y por el aumento del estrés oxidativo lo que da lugar a la aparición de las arritmias ventriculares (Tamayo *et al.*, 2020).

Otros estudios se han centrado en el análisis de la expresión de diversos microRNAs (miRNAs) en distintos tejidos del modelo murino hipomorfo. Los miRNAs son un tipo de RNA de cadena simple no codificante de unos 22 nucleótidos de longitud cuya función es regular la expresión génica a nivel postranscripcional (Rivera-Barahona *et al.*, 2017c). Los miRNAs desempeñan funciones específicas en cada tejido y están implicados en la regulación de distintos procesos fisiológicos como proliferación, diferenciación, muerte celular, metabolismo, etc. (Correia de Sousa *et al.*, 2019). La desregulación de su expresión tiene un gran impacto en la fisiología celular y, por tanto, en el desarrollo de enfermedades como las neurodegenerativas (Juzwik *et al.*, 2019), metabólicas (Vienberg *et al.*, 2017), cardiovasculares (Wojciechowska *et al.*, 2017) y cáncer (Cortez *et al.*, 2019), entre otras. Los estudios en el modelo murino hipomorfo de AP han mostrado una desregulación de varios miRNAs, como el aumento del miR-34a, miR-338 y miR-350 en corazón, cerebro e hígado, lo cual podría contribuir al desarrollo de la AP (Rivera-Barahona *et al.*, 2017b).

### 1.6.2. Modelos celulares

El modelo celular más utilizado hasta la fecha son los fibroblastos de pacientes (Schwab *et al.*, 2006, de Keyzer *et al.*, 2009, Gallego-Villar *et al.*, 2014, Collard *et al.*, 2018) debido, principalmente, a su facilidad de obtención mediante biopsias de piel y a que mantienen el fondo genético del propio paciente. Destaca además su estabilidad en cultivo hasta los 15-20 pases y la robustez de los resultados que se obtienen al ser utilizados para modelar una enfermedad (Auburger *et al.*, 2012). Sin embargo, presentan ciertas limitaciones como la imposibilidad de mantenimiento en cultivo de forma indefinida y las diferencias en pureza y ritmo de crecimiento en función del número de pases y de la edad del paciente donador (Kalman *et al.*, 2016). Además, son particularmente ineficaces para el estudio del metabolismo mitocondrial ya que presentan unas características metabólicas propias y son resistentes a la mayoría de los estresores (Hu *et al.*, 2019).

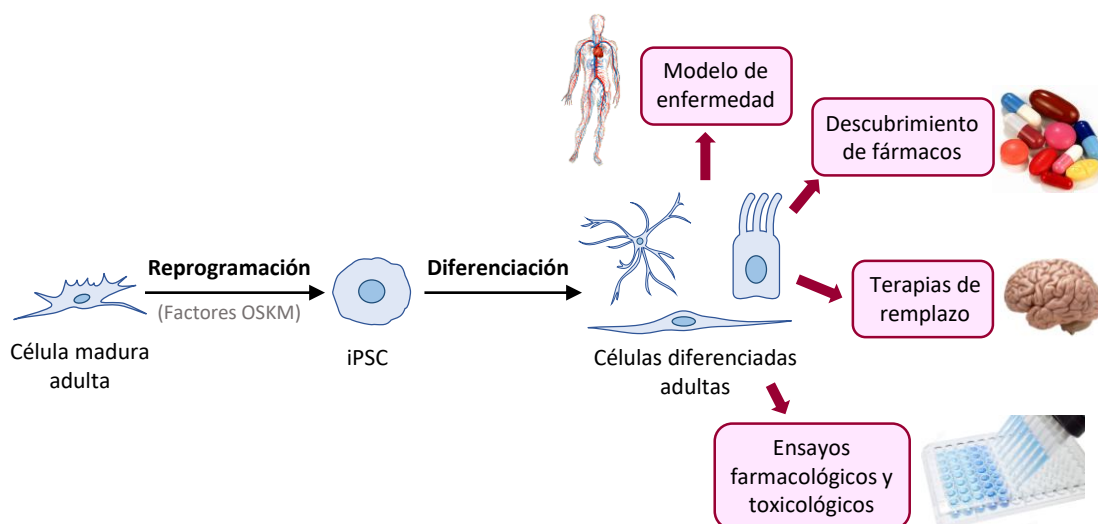
## 2. Modelos de enfermedad basados en células madre

Las limitaciones que presentan los fibroblastos, mencionadas anteriormente, y las de los modelos animales, como la variabilidad genética entre especies, los elevados costes de su mantenimiento y la imposibilidad de modelar algunas enfermedades, han fomentado la búsqueda de modelos celulares humanos alternativos (Hartung, 2008). De este modo, las células madre han cobrado una especial relevancia ya que son células desdiferenciadas, capaces de autorenovarse de forma indefinida y con carácter pluripotente lo que les permite diferenciarse a cualquier tipo celular. Pueden ser obtenidas de tejido fetal o embrionario o de localizaciones específicas del organismo adulto, pero los conflictos éticos asociados a su uso junto al rechazo inmune que puede producirse por tratarse de un trasplante alogénico limitan sus aplicaciones (Bacakova *et al.*, 2018). Por todo ello, el descubrimiento de Takahashi y Yamanaka de que células somáticas adultas pueden ser reprogramadas a células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), que son células con expresión genética y epigenética similar a las células madre y con la misma capacidad de diferenciación, supuso una gran revolución científica (Takahashi y Yamanaka, 2006).

La reprogramación a iPSCs puede llevarse a cabo partiendo de células adultas fácilmente accesibles como fibroblastos, queratinocitos, células madre hematopoyéticas, etc. Habitualmente, se usa una combinación de 4 factores conocidos como OSKM (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*) (Takahashi y Yamanaka, 2006). Se han desarrollado diversas tecnologías para llevar a cabo la reprogramación, entre ellas se encuentra el uso de vectores retrovirales y lentivirales, pero presentan el riesgo de integración en regiones clave del genoma. Este hecho ha propiciado el desarrollo de nuevos métodos no integrativos, siendo los más usados los basados en el virus Sendai, los DNA episomales y los RNA sintéticos (Doss y Sachinidis, 2019). Las iPSCs presentan diversas aplicaciones relevantes y abren nuevas fronteras en la ciencia médica no solo como modelo de enfermedad, sino que también exhiben un gran potencial para el descubrimiento de fármacos y para la realización de ensayos farmacológicos y toxicológicos, así como para su uso en terapias de replazo en el campo de la medicina personalizada (Wiegand y Banerjee, 2019) (**Figura 3**).

Entre las ventajas del uso de las iPSCs para generar modelos de enfermedad podemos destacar su facilidad de cultivo, que constituyen una fuente inagotable de material biológico y que son específicas de cada paciente con lo que permiten establecer buenas correlaciones genotipo-fenotipo. Además, nos permiten generar tipos celulares de difícil obtención en un organismo adulto y son susceptibles de ser manipuladas genéticamente con sistemas de edición génica como CRISPR/Casp9 (Karagiannis *et al.*, 2019). Es especialmente relevante el uso de los cardiomiocitos derivados de iPSCs para el modelaje de enfermedades cardiovasculares, como arritmias, HCM y DCM, por lo que se han desarrollado múltiples protocolos para optimizar su diferenciación y maduración, aunque sus propiedades electrofisiológicas aún no son idénticas a las de los cardiomiocitos adultos humanos

(Yoshida y Yamanaka, 2017, Chun *et al.*, 2018). También es relevante su aplicación en el modelaje de enfermedades neurológicas ya que los cultivos primarios de neuronas son difíciles de conseguir y, normalmente, la cantidad de células es insuficiente para la realización de algunos experimentos (Engle *et al.*, 2018). Además, existen protocolos de diferenciación a casi todos los tipos de células neuronales y gliales existentes con lo que permiten el estudio de un amplio espectro de desórdenes como Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, etc., aunque su mayor limitación es la falta de reproducibilidad del carácter neurodegenerativo y acumulativo de estas enfermedades (Li, L. *et al.*, 2018).



**Figura 3. Generación y diferenciación de las iPSCs y sus aplicaciones.** Esquema representativo de la reprogramación de células maduras adultas a iPSCs mediante los factores OSKM (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*) y su posterior diferenciación a distintos tipos celulares que pueden tener diversas aplicaciones en el campo de la investigación, la industria farmacéutica y la medicina personalizada.

Las limitaciones que presentan los modelos derivados de iPSCs son, principalmente, las variaciones interclonales genéticas, epigenómicas y transcripcionales que derivan de los procesos de reprogramación y diferenciación y que generan una gran heterogeneidad que dificulta la reproducibilidad de los ensayos. Además, su inmortalidad puede llevar a la acumulación de alteraciones genéticas por lo que es importante realizar controles rutinarios de su estabilidad. Sin embargo, el mayor desafío reside en la optimización de los protocolos para la obtención de cultivos homogéneos de células diferenciadas que recapitulen todas las propiedades de una célula adulta (Doss y Sachinidis, 2019, Karagiannis *et al.*, 2019). Por otro lado, la falta de interacciones complejas que se dan en los tejidos de un organismo ha llevado a desarrollar otros modelos más complejos como los organoides o las quimeras basadas en trasplantes xenográficos de iPSCs. Este tipo de modelos ha permitido el modelaje de fenotipos patológicos complejos como los producidos en enfermedades infecciosas o cáncer, ya que reflejan las alteraciones a nivel de órgano o de tejido (Rowe y Daley, 2019).

### 3. La mitocondria y sus funciones

Las mitocondrias son consideradas la factoría energética de las células ya que es donde se produce la mayoría del ATP requerido para el correcto funcionamiento celular. Las mitocondrias poseen su propio DNA, el mtDNA, que se replica de forma independiente y codifica principalmente proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa; el resto de las proteínas requeridas para la estructura y función mitocondrial están codificadas por el DNA nuclear (Annesley y Fisher, 2019).

Además de en la producción de ATP, las mitocondrias intervienen en el metabolismo energético mediante la producción de precursores de macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Por otro lado, durante el metabolismo mitocondrial se generan subproductos, como amonio o ROS, cuya detoxificación es fundamental para el correcto funcionamiento celular ya que participan en la señalización de muchos procesos complejos como autofagia, muerte celular o estrés del retículo endoplásmico (RE) (Spinelli y Haigis, 2018). Estas observaciones ponen de manifiesto la gran relevancia que tiene la disfunción mitocondrial en el desarrollo de enfermedades neurológicas (Belenguer *et al.*, 2019), cardiovasculares (Sabbah, 2020), metabólicas (Bhatti *et al.*, 2017) o cáncer (Anderson *et al.*, 2018).

#### 3.1| Metabolismo energético mitocondrial

La mitocondria es considerada el principal orgánulo donde se llevan a cabo las funciones metabólicas de la célula (Osellame *et al.*, 2012). El catabolismo de macromoléculas como hidratos de carbono, lípidos y proteínas se produce en la mitocondria, ya que cada uno de estos sustratos puede ser catabolizado a acetil-CoA que es capaz de entrar en el ciclo de Krebs (Martinez-Reyes y Chandel, 2020). En este proceso se generan las formas reducidas NADH y FADH<sub>2</sub> cuyo poder reductor va a ser utilizado para generar un gradiente electroquímico que permite la síntesis de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa (Wilson, 2017).

Las alteraciones en el metabolismo energético no solo se deben a defectos en genes implicados en el metabolismo mitocondrial, como sucede en las enfermedades mitocondriales (Annesley y Fisher, 2019), sino que también puede deberse a la acumulación de metabolitos tóxicos, lo cual es especialmente relevante en el caso de las EMHs (Wajner y Goodman, 2011, Stepien *et al.*, 2017) y, particularmente, en las acidemias orgánicas (Dimitrov *et al.*, 2020). Como se ha comentado en la sección anterior, en el caso de la AP, la acumulación de propionil-CoA y sus derivados metabólicos provoca la inhibición de diversas enzimas mitocondriales que conducen a un déficit energético (Wongkittichote *et al.*, 2017) potencialmente implicado en el desarrollo de alteraciones neurológicas y cardiovasculares (Haijes *et al.*, 2019a).

### 3.2| Biogénesis mitocondrial

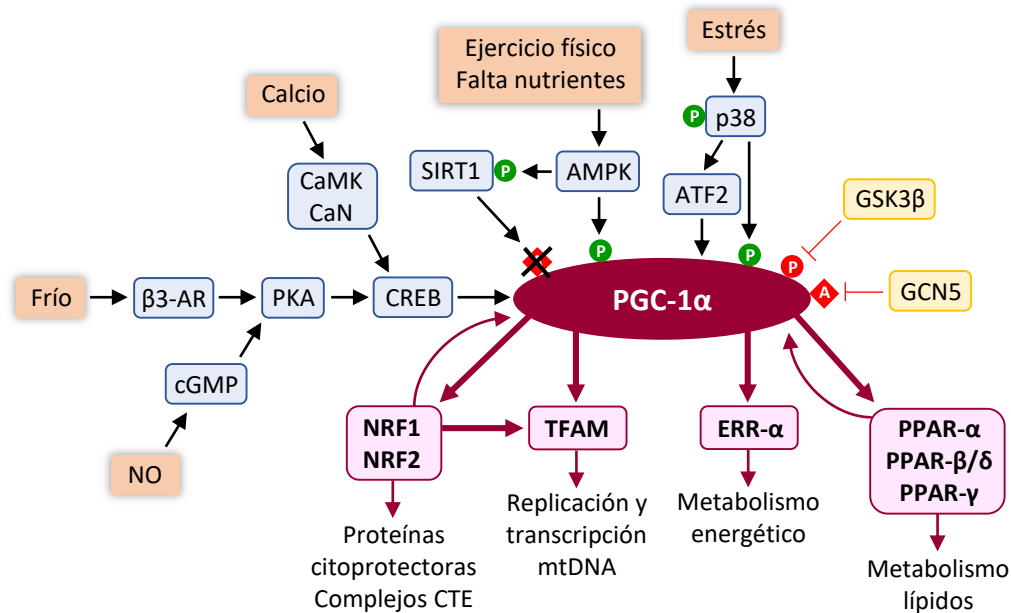
La homeostasis mitocondrial está definida por la coordinación entre dos procesos opuestos: la generación de nuevas mitocondrias, lo cual se conoce como biogénesis mitocondrial, y la eliminación de mitocondrias dañadas, la mitofagia (Palikaras y Tavernarakis, 2014). La biogénesis mitocondrial es un proceso en el que se produce un aumento de la masa mitocondrial por el crecimiento y la división de las mitocondrias ya existentes. Esto implica la replicación del mtDNA, la síntesis de las membranas mitocondriales, la síntesis de proteínas codificadas por el mtDNA y la importación de proteínas codificadas por el DNA nuclear (Li, P. A. *et al.*, 2017).

La síntesis de nuevas mitocondrias constituye un proceso complejo cuya regulación se produce por varios mecanismos que determinan el nivel de expresión y activación del co-activador transcripcional PGC-1 $\alpha$ , que es considerado el regulador principal de la biogénesis mitocondrial ya que coordina la expresión de genes codificados por el genoma nuclear y mitocondrial (Popov, 2020). Los mecanismos regulatorios más importantes son los mediados por la quinasa activada por AMP (AMPK) y por la deacetilasa sirtuina 1 (SIRT1) (Li, P. A. *et al.*, 2017). Fisiológicamente, la activación de AMPK está mediada por el ejercicio físico o la falta de nutrientes y da lugar a la fosforilación y activación de PGC-1 $\alpha$ . A su vez, AMPK fosforila y activa SIRT1 que lleva a cabo la deacetilación de PGC-1 $\alpha$  promoviendo su activación. Por otro lado, la expresión transcripcional de PGC-1 $\alpha$  se regula, principalmente, por el factor de transcripción CREB que puede activarse en respuesta a las señales de calcio mediadas por la calmodulina quinasa dependiente de calcio (CaMK) o la calcineurina (CaN), por la señalización mediada por óxido nítrico o por la respuesta al frío a través del receptor adrenérgico  $\beta$ 3-AR (Gureev *et al.*, 2019). Además, la activación de la proteína de estrés p38 puede llevar a un aumento de la expresión de PGC-1 $\alpha$  por medio del factor de transcripción ATF2 y de su activación postraduccional por fosforilación (Dorn *et al.*, 2015). Por el contrario, la inhibición de PGC-1 $\alpha$  se produce, principalmente, mediante la fosforilación por la glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) y la acetilación por GCN5 (Gureev *et al.*, 2019) (**Figura 4**).

Como se ha mencionado anteriormente, PGC-1 $\alpha$  es el regulador principal de esta vía pero, en menor grado, también interviene otro factor de la misma familia, PGC-1 $\beta$ , que presenta algunas funciones solapantes (Villena, 2015). Con la activación de PGC-1 $\alpha$  se produce un aumento de la expresión de los factores respiratorios nucleares (NRF1 y NRF2), del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), del receptor de estrógenos  $\alpha$  (ERR- $\alpha$ ) y de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) (Dorn *et al.*, 2015). NRF1 y NRF2 regulan, virtualmente, la expresión de todos los complejos de la CTE y promueven la expresión de proteínas citoprotectoras como enzimas antioxidantes y antiinflamatorias y, junto a PGC-1 $\alpha$ , promueven la expresión de TFAM, que es imprescindible para la replicación y transcripción del mtDNA (Li, P. A. *et al.*, 2017, Gureev *et al.*, 2019). ERR- $\alpha$  está implicado en la regulación del metabolismo energético celular ya



que interviene en el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos. La familia PPAR (constituida por PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  y PPAR- $\gamma$ ) es la principal reguladora del metabolismo de lípidos (Dorn *et al.*, 2015). Asimismo, existen mecanismos regulatorios por retroalimentación ya que NRF2 y PPAR- $\alpha$  regulan a su vez la expresión de PGC-1 $\alpha$  (Gureev *et al.*, 2019) (**Figura 4**).



**Figura 4. Regulación de la biogénesis mitocondrial.** Esquema que representa la regulación del principal controlador de la biogénesis mitocondrial PGC-1 $\alpha$ . Su activación a nivel transcripcional está mediada de forma directa por CREB e, indirecta, por P-p38 que actúan en respuesta a distintos estímulos como calcio, frío, NO y estrés. Su activación a nivel postraduccional está mediada por fosforilación por P-p38 y AMPK y deacetilación por SIRT1. GSK3 $\beta$  y GCN5 participan en su inhibición por fosforilación y acetilación, respectivamente. La activación de PGC1- $\alpha$  aumenta la expresión de distintos factores que controlan la formación de nuevas mitocondrias y que regulan el metabolismo energético. AMPK: quinasa activada por AMP; ATF2: factor de transcripción 2; CaMK: calmodulina quinasa; CaN: calcineurina; cGMP: guanósín monofosfato cíclico; CREB: elemento de respuesta a AMPc; CTE: cadena de transporte de electrones; ERR- $\alpha$ : receptor de estrógenos  $\alpha$ ; GCN5: histona acetiltransferasa; GSK3 $\beta$ : glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ ; mtDNA: DNA mitocondrial; NO: óxido nítrico; NRF: factores respiratorios nucleares; p38: proteína quinasa activada por mitógenos; PGC-1 $\alpha$ : coactivador 1 $\alpha$  de PPAR- $\gamma$ ; PKA: proteína quinasa A; PPAR: receptores activados por proliferadores de peroxisomas; SIRT1: sirtuina 1; TFAM: factor de transcripción mitocondrial A;  $\beta$ 3-AR: receptor adrenérgico  $\beta$ 3.

### 3.3| Estrés oxidativo

El término ROS se refiere a un conjunto de moléculas reactivas derivadas del metabolismo del oxígeno, siendo las más comunes el anión superóxido (O $_2^{\bullet}$ ), el radical hidroxilo (HO $^{\bullet}$ ) y el peróxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$ ) (Pizzino *et al.*, 2017). Aunque las ROS pueden generarse en múltiples compartimentos celulares, el 90% se produce en la mitocondria, principalmente, a nivel de la CTE ya que son un subproducto derivado de la transferencia de electrones durante la fosforilación oxidativa (Nissanka y Moraes, 2018). Además, recientemente se ha descrito que pueden ser producidas por otras enzimas mitocondriales como la  $\alpha$ CGDH, la PDH y el complejo deshidrogenasa

de  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada (Larosa y Remacle, 2018). De forma fisiológica, las ROS están implicadas en la señalización de procesos esenciales como proliferación, inflamación, senescencia y muerte celular, aunque su desregulación puede llevar a un estado patológico conocido como estrés oxidativo. En esta situación, las ROS pueden generar daño oxidativo en biomoléculas como lípidos, proteínas y DNA que pueden dar lugar a disfunción mitocondrial, daño en el mtDNA y déficit energético celular (Nissanka y Moraes, 2018) pudiéndose activar procesos de muerte celular (D'Arcy, 2019).

Las células han desarrollado sistemas de defensa antioxidante que mantienen en estrecho control el nivel de ROS y pueden clasificarse en métodos no enzimáticos y enzimáticos. Dentro de los métodos no enzimáticos se encuentran moléculas de bajo peso molecular como glutatión, vitamina E y flavonoides que actúan como *scavengers* de las ROS (Pizzino *et al.*, 2017). Por otro lado, las células poseen una serie de enzimas que catalizan la eliminación de las ROS como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y peroxirredoxinas (PRX). Las SOD son una familia de metaloenzimas encargadas de la detoxificación del radical  $O_2^{\bullet}$  en otra especie menos reactiva, el  $H_2O_2$ , en distintos compartimentos celulares, siendo SOD2/MnSOD la que se localiza en la matriz mitocondrial. Posteriormente, las enzimas CAT, GPx o PRX son las que catalizan el paso final de reducción del  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$  (Peoples *et al.*, 2019), lo cual es fundamental para evitar que derive en el radical  $HO^{\bullet}$  en presencia de metales de transición reducidos por la reacción de Fenton (Winterbourn, 1995). GPx es una superfamilia de proteínas que se encuentran localizadas en distintas fracciones celulares, siendo GPx1 la más relevante y de localización citoplasmática (Lei *et al.*, 2016). CAT es una enzima fundamentalmente de localización peroxisomal, aunque también se ha encontrado en mitocondrias cardíacas (Peoples *et al.*, 2019).

La alteración de la homeostasis redox provoca una alteración en distintas vías de señalización que pueden comprometer la función celular (Pizzino *et al.*, 2017). Una de estas vías es la mediada por las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) p38, JNK y ERK, cuya función es la regulación de diversos procesos celulares como proliferación, diferenciación, apoptosis e inflamación. La activación de JNK y p38 está mediada por una cascada de señalización que se inicia en respuesta a distintos estresores, siendo el más importante el estrés oxidativo, y que finaliza con la fosforilación y activación de factores de transcripción como ATF2 o c-MYC y proteínas proapoptóticas como BCL-2 y BAD, entre otras (Kim y Choi, 2015). Su función es especialmente relevante en el sistema cardiovascular ya que están implicadas en procesos de remodelación y de control de la función cardíaca de forma que su alteración da lugar a patologías cardiovasculares como fibrosis o HCM (Javadov *et al.*, 2014, Turner y Blythe, 2019).

Numerosos trabajos han recogido la contribución de la alteración de la homeostasis redox al desarrollo de diferentes patologías, especialmente aquellas relacionadas con la edad, como las

enfermedades neurodegenerativas (Nissanka y Moraes, 2018), cardiovasculares (Peoples *et al.*, 2019) y cáncer (Moloney y Cotter, 2018), así como en las EMHs (Olsen *et al.*, 2015, Richard *et al.*, 2018). Por ello, en los últimos años se han testado diferentes compuestos antioxidantes como terapia adyuvante de muchas patologías, incluyendo algunas EMHs como la adrenoleucodistrofia (Morato *et al.*, 2015), la enfermedad de jarabe de arce (Scaini *et al.*, 2012) o la AP (Gallego-Villar *et al.*, 2014).

### 3.4| Muerte celular

En los organismos multicelulares es importante que se mantenga un balance homeostático entre las células nuevas que se generan por mitosis y las dañadas que sufren procesos de muerte celular. Estas células pueden ser destruidas de forma programada o de forma no controlada, lo que resulta en el esparcimiento de restos celulares por todo el tejido. Dentro de las formas programadas, la más frecuente es la apoptosis (D'Arcy, 2019); además, se encuentran la autofagia, proceso por el que se eliminan componentes celulares dañados y que puede activar vías de muerte celular; la piroptosis, que es un tipo de respuesta antimicrobiana que provoca inflamación; y la ferroptosis, que está causada por la acumulación de ROS derivadas del metabolismo del hierro (Gudipaty *et al.*, 2018). Por otro lado, encontramos la necrosis, que es un tipo de muerte celular no controlada en respuesta a daños externos y que conlleva una gran respuesta inflamatoria. La necroptosis es un tipo especial de necrosis que difiere de ésta por ser un mecanismo programado (D'Arcy, 2019).

La apoptosis es el proceso de muerte celular programada por el cual una célula deja de crecer y, en su lugar, comienza una cascada de señalización que finaliza con la destrucción de la célula sin causar daños en los tejidos colindantes (Grilo y Mantalaris, 2019). Las proteínas implicadas en este proceso son unas proteasas conocidas como caspasas que se clasifican en iniciadoras (Casp 3, 6 y 7) y ejecutoras (Casp 8 y 9). La activación de las caspasas iniciadoras puede darse en respuesta a estímulos externos, por interacción con unos receptores conocidos como *death receptors*, o internos, en respuesta a falta de nutrientes, hipoxia, estrés oxidativo, proteínas mal plegadas, etc. (D'Arcy, 2019). La forma activa de estas caspasas permite el procesamiento y activación de las ejecutoras de forma que se genera una cascada de eventos que resultan en la fragmentación del DNA, la destrucción del citoesqueleto y la envuelta nuclear, el hinchamiento de las mitocondrias, la expresión de ligandos fagocíticos y la formación de cuerpos apoptóticos (Grilo y Mantalaris, 2019). Muchos estudios han demostrado el potencial efecto beneficioso del uso de fármacos dirigidos hacia la regulación de la apoptosis en diversas enfermedades como las neurodegenerativas (Chi *et al.*, 2018), cardiovasculares (Del Re *et al.*, 2019) o cáncer (Pentimalli *et al.*, 2019).

La mitocondria juega un papel relevante en el control de la apoptosis, especialmente en la respuesta a estímulos intrínsecos. Señales como daño en el DNA, aumento del calcio o del estrés

oxidativo provocan la activación de las proteínas proapoptóticas BAX y BAK que se van a localizar en la membrana mitocondrial formando un canal que permite la permeabilización de la mitocondria en un proceso conocido como permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP). De esta forma, se liberan al citoplasma otros factores proapoptóticos que estaban retenidos en la mitocondria como el citocromo c, el factor inductor de la apoptosis o las proteínas Smac, que van a participar en el proceso de activación de las caspasas y muerte celular (Vakifahmetoglu-Norberg *et al.*, 2017, Bock y Tait, 2020).

Por otro lado, distintos estímulos como el aumento del calcio intracelular o de las ROS pueden provocar la apertura del poro de transición mitocondrial (MPTP) que consiste en un complejo que se localiza en la membrana mitocondrial interna y que puede formar un poro no selectivo cuya apertura puede producirse en períodos largos o cortos de tiempo (Rottenberg y Hoek, 2017). Se trata de una estructura compleja, cuyos componentes aún no se conocen con exactitud, aunque se postula que la subunidad c de la ATPasa es uno de sus elementos (Chinopoulos, 2018). Su apertura se encuentra estrictamente regulada, entre otros, por la ciclofilina D (CypD) que promueve la apertura del poro por aumento de calcio, fosfato inorgánico y ROS (Porter y Beutner, 2018). Aunque tiene un papel importante en el correcto funcionamiento celular, su apertura completa y prolongada en el tiempo provoca un aumento de la producción de ROS y la salida de la mayoría de los metabolitos mitocondriales de forma que se produce daño oxidativo a biomoléculas, se disipa el potencial de membrana y se inhibe el metabolismo mitocondrial (Winqvist y Gribkoff, 2020). Todo ello pone en marcha una serie de cascadas de señalización que, junto a la salida de proteínas proapoptóticas como el citocromo c, van a promover la muerte celular por necrosis (Rottenberg y Hoek, 2017) o apoptosis (Quintanilla *et al.*, 2017).

### 3.5| Relación entre la mitocondria y el RE

El calcio actúa como una molécula señalizadora en muchas vías fisiológicas y tiene un papel relevante en la función mitocondrial (Rossi *et al.*, 2019). Se encuentra concentrado, principalmente, en el RE que lo libera o lo retiene en respuesta a distintos estímulos. El RE y las mitocondrias se encuentran conectados a través de unas estructuras conocidas como membranas asociadas a las mitocondrias (MAMs) cuya función es la regulación de la homeostasis del calcio, la síntesis de lípidos, el plegamiento de proteínas y la autofagia (Chernorudskiy y Zito, 2017). La chaperona GRP75 forma parte de un complejo que permite el intercambio de calcio entre ambos orgánulos y controla la arquitectura de estos sitios de unión (Silva-Palacios *et al.*, 2020). Además, interviene en la muerte celular ya que parte de la CypD se encuentra unida a este complejo y, en presencia de altas concentraciones de calcio, se disocia y provoca la apertura del MPTP (Porter y Beutner, 2018). La mitofusina 2 (MFN2) es la encargada de estabilizar y regular la interacción de estas uniones y tiene un papel relevante en el control de la señalización por calcio en las MAMs (Silva-Palacios *et al.*,

2020). Además, la MFN2 está implicada en la fisión mitocondrial y actúa conjuntamente con el RE en la formación de las membranas mitocondriales (Yu y Pekkurnaz, 2018). Otro componente es el receptor  $\delta$ -1 (SIG-1R) que interacciona con otras chaperonas endoplásmicas como GRP78 alargando la señalización por calcio y, además, participa en el reclutamiento de lípidos para la formación de las MAMs (Rodríguez-Arribas *et al.*, 2017).

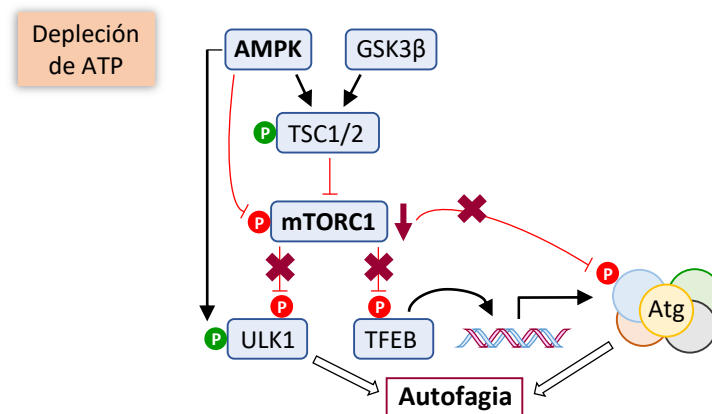
El RE es el orgánulo encargado de la síntesis, plegamiento y ensamblaje de proteínas secretoras por lo que alteraciones en la homeostasis del calcio, acumulación de proteínas mutadas o de estrés oxidativo generan estrés del RE y se induce una respuesta conocida como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (Saito y Imaizumi, 2018). La función de la UPR es restaurar la actividad de las proteínas mal plegadas o iniciar su destrucción para evitar daños celulares irreversibles, aunque en caso de que el daño al RE sea irreparable se induce la muerte celular por apoptosis (Li, J. *et al.*, 2019). La UPR comienza con la activación de los tres sensores de estrés del RE: el factor de transcripción ATF6, la quinasa del RE PERK y la quinasa dependiente de inositol IRE1 (Saito y Imaizumi, 2018). En condiciones normales, estas proteínas transmembrana se encuentran secuestradas por la chaperona GRP78, pero en condiciones de estrés, GRP78 se disocia y se activan distintas rutas de señalización (Li, J. *et al.*, 2019). Una de ellas produce la activación del factor de transcripción ATF4 que controla la expresión de genes implicados en el plegamiento de proteínas, autofagia, metabolismo de aminoácidos y apoptosis (Hetz *et al.*, 2015). Además, ATF4 induce la expresión de otro factor de transcripción conocido como CHOP cuya expresión prolongada promueve la apoptosis (Saito y Imaizumi, 2018). También se induce la expresión de HERP que tiene un papel protector ya que inhibe la muerte celular por apoptosis mediante la inducción de la autofagia y promueve el mecanismo de degradación de proteínas conocido como ERAD (Chen, F. *et al.*, 2019) por el cual las proteínas mal plegadas del RE son transportadas al citosol, poliubiquitinadas y degradadas por el proteasoma (Wu, X. y Rapoport, 2018).

## 4. Autofagia

La autofagia es el proceso por el cual componentes celulares son secuestrados y degradados por los lisosomas para su reciclado o para la obtención de energía. Puede ser iniciada por una variedad de estresores, como la deprivación nutricional, por señales durante la diferenciación celular y por la presencia de orgánulos dañados o de patógenos (D'Arcy, 2019). Hay tres tipos de autofagia: la macroautofagia (a la cual nos referiremos a partir de ahora como autofagia), por la que regiones enteras de las células son encapsuladas en vesículas de doble membrana conocidas como autofagosomas que posteriormente se fusionan con los lisosomas para la degradación de su contenido; la microautofagia, que permite la degradación específica de orgánulos como mitocondrias (mitofagia) o peroxisomas (pexofagia) por fusión directa con los lisosomas; y la autofagia mediada por chaperonas, en la que proteínas específicas son dirigidas directamente a los lisosomas (Saha *et al.*, 2018). Además, estudios recientes han descubierto un nuevo tipo de muerte celular debido a un aumento exacerbado de la autofagia conocido como autosis (Denton y Kumar, 2019).

Brevemente, la autofagia consiste en un proceso complejo que se inicia cuando hay un requerimiento de energía que conduce a la activación del complejo quinasa ULK1 lo cual activa una cascada de señalización que recluta a distintas proteínas, siendo las más importantes las proteínas iniciadoras de la autofagia (Atg), para la formación del autofagosoma. En ese momento, la proteína asociada a microtúbulos 1A/1B de cadena ligera 3B (LC3BI) sufre un proceso de lipoilación, de forma que se convierte en LC3BII, y puede ser reclutada a la membrana del autofagosoma para permitir su maduración y fusión con el lisosoma (Saha *et al.*, 2018).

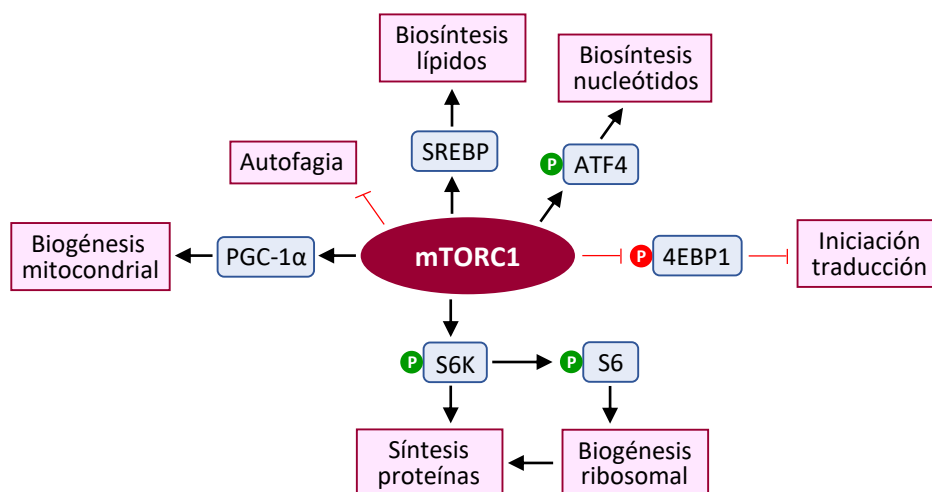
Aunque la autofagia puede verse influida por diversas vías de señalización, los dos reguladores principales son el complejo quinasa conocido como mTOR y la AMPK (Sciarretta *et al.*, 2018a). mTOR está formado por dos complejos, mTORC1 y mTORC2, de los cuales mTORC1 es considerado el mayor represor de la autofagia. Cuando hay un nivel alto de energía, mTORC1 está activo e inhibe mediante fosforilación a ULK1 de forma que se impide la iniciación de la autofagia (Tamargo-Gomez y Marino, 2018). Además, impide la transcripción de los genes *Atg* porque fosforila e inhibe el factor de transcripción TFEB (Sciarretta *et al.*, 2018a). mTORC1 también participa en la inhibición directa, por fosforilación, de algunas de estas proteínas Atg de forma que se impide la formación del autofagosoma (Sciarretta *et al.*, 2018b). Por el contrario, en un estado de depleción de ATP, mTORC1 se encuentra inhibido y se promueve la autofagia. La AMPK es uno de los mayores sensores de falta de nutrientes, por tanto, cuando hay un requerimiento de energía se produce su activación, que va a tener un efecto positivo sobre ULK1 (Tamargo-Gomez y Marino, 2018). Además, la AMPK inhibe mTORC1 de forma directa, a través de su fosforilación, y de forma indirecta ya que, junto a GSK3 $\beta$ , fosforilan y activan a TSC1/2 que es un conocido inhibidor de mTORC1 (Sciarretta *et al.*, 2018a) (**Figura 5**).



**Figura 5. Regulación de la autofagia.** Esquema que representa la activación de la autofagia en un estado de requerimiento de energía. La depleción de ATP promueve la activación de AMPK y GSK3 $\beta$  que van a inhibir mTORC1 que, a su vez, es inhibidor de la autofagia por la fosforilación de la proteína iniciadora ULK1 y por la inhibición transcripcional y postraduccionnal de las proteínas Atg. AMPK: quinasa activada por AMP; Atg: proteínas activadoras de la autofagia; GSK3 $\beta$ : glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ ; mTORC1: complejo sensible a rapamicina; TFEB: factor de transcripción EB; TSC1/2: complejo de esclerosis tuberosa 1/2; ULK1: quinasa activadora de la autofagia 1.

#### 4.1| Papel de mTORC1 y autofagia en el sistema cardiovascular

El complejo mTORC1 está implicado en muchos procesos fisiológicos y su papel es especialmente relevante en el corazón ya que se encarga del control del desarrollo embrionario cardiovascular y de preservar la estructura y función cardíaca en condiciones de estrés. mTORC1 es el regulador principal del crecimiento celular en respuesta a diferentes estímulos como el nivel de nutrientes, hipoxia o daño en el DNA, ya que promueve la síntesis de biomoléculas e inhibe vías catabólicas como la autofagia (Sciarretta *et al.*, 2018b). En condiciones de niveles elevados de energía, la síntesis de proteínas es promovida principalmente por la fosforilación de la proteína de unión al factor de iniciación de la traducción 4B (4EBP1) y de la proteína ribosomal S6 quinasa (S6K). La fosforilación de 4EBP1 produce su inhibición de forma que libera un factor necesario para la iniciación de la traducción. Sin embargo, la fosforilación de S6K provoca su activación que, a su vez, fosforila otros factores requeridos para la traducción de proteínas (Boutouja *et al.*, 2019). Entre ellas se encuentra la proteína ribosomal S6 que forma parte de la subunidad ribosomal 40S y, por tanto, aumenta la biogénesis de los ribosomas que son los encargados de la síntesis de proteínas (Tavares *et al.*, 2015). Además, el efecto positivo de mTORC1 sobre PGC-1 $\alpha$  promueve la biogénesis mitocondrial con lo que aumenta el metabolismo energético (Xu, L. y Brink, 2016). Por otro lado, la activación de mTORC1 promueve la biosíntesis de lípidos y de colesterol por activación de la proteína SREBP y la biosíntesis de nucleótidos por activación del factor de transcripción ATF4 (Boutouja *et al.*, 2019) (Figura 6).



**Figura 6. Señalización mediada por mTORC1.** Esquema que representa el efecto positivo de mTORC1 sobre el crecimiento celular mediante la activación del eje S6K-S6 y la inhibición de 4EBP1 de forma que se induce la biogénesis ribosomal y la síntesis de proteínas. Además, mTORC1 inhibe la autofagia e induce la biogénesis mitocondrial y la biosíntesis de lípidos y nucleótidos. 4EBP1: proteína de unión al factor de iniciación de la traducción 4B; ATF4: factor de transcripción activador 4; mTORC1: complejo sensible a rapamicina; PGC-1 $\alpha$ : coactivador 1 $\alpha$  de PPAR- $\gamma$ ; SREBP: proteína de unión al elemento regulador del estero; S6: proteína ribosomal S6; S6K: proteína ribosomal S6 quinasa.

El proceso autofágico es especialmente relevante para el correcto funcionamiento cardíaco ya que preserva su función y estructura en condiciones basales y es sobreactivado en situaciones de estrés limitando así el daño cardíaco. En células que han perdido la capacidad de autorenovación, como los cardiomiocitos, es especialmente relevante la eliminación de agregados de proteínas mal plegadas y de orgánulos defectuosos (Mialet-Perez y Vindis, 2017). En este sentido, la autofagia juega un papel importante en el control de calidad de proteínas ya que la proteína autofágica p62 es la encargada de reconocer proteínas ubiquitinadas y presentarlas al autofagosoma para su posterior degradación (Pickles *et al.*, 2018). Además, juega un papel importante en el mantenimiento de la función mitocondrial, lo cual es fundamental para la correcta función cardíaca, ya que limita la muerte celular en respuesta a falta de nutrientes (Sciarretta *et al.*, 2018a). Por otro lado, la mitofagia es la encargada de la eliminación de mitocondrias defectuosas con lo que previene la disfunción mitocondrial y el aumento del estrés oxidativo (Pickles *et al.*, 2018).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la implicación de las alteraciones del proceso autofágico y de las rutas de señalización de mTOR en el desarrollo de numerosas patologías cardíacas (Mialet-Perez y Vindis, 2017, Sciarretta *et al.*, 2018b, Yamaguchi, 2019). Diversos fármacos dirigidos contra estas dianas han mostrado efectos beneficiosos para la mejora de la función cardíaca; entre ellos, es especialmente destacable el uso de la rapamicina, cuya función es la inhibición de mTORC1 (Yoo *et al.*, 2017). La rapamicina, y sus compuestos derivados, han resultado ser efectivos para la reducción del daño por isquemia-reperfusión (Ma, X. *et al.*, 2016), para la prevención de cardiomiopatías asociadas a diabetes (Das *et al.*, 2014) o para el tratamiento de HCM (Fleming *et al.*, 2018) y fallo cardíaco (Zhang *et al.*, 2019).



# OBJETIVOS



El **objetivo principal** de este trabajo ha consistido en completar la caracterización del modelo murino hipomorfo de AP y generar nuevos modelos celulares humanos de enfermedad para profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de la AP, centrándonos especialmente en las alteraciones cardíacas y neurológicas asociadas, así como en la identificación de dianas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

De este modo, se marcaron los siguientes **objetivos específicos**:

- 1** Estudio *in vivo* de vías que contribuyen a la fisiopatología de la AP relacionadas con la función mitocondrial y la homeostasis redox, utilizando el modelo murino hipomorfo para completar su caracterización.
- 2** Análisis del proceso de autofagia y algunas de sus vías regulatorias y estudio del potencial efecto terapéutico de la rapamicina en el modelo murino de AP.
- 3** Generación y caracterización de dos líneas de iPSCs a partir de fibroblastos de pacientes AP.
- 4** Generación de nuevos modelos celulares humanos basados en la diferenciación de las iPSCs a astrocitos (iAs), neuronas (iNs) GABAérgicas y cardiomiocitos (iCMs) inducidos y caracterización de las distintas vías fisiopatológicas alteradas en estos modelos.

# MATERIALES Y MÉTODOS



---

# Materiales y Métodos

---

## 1. Materiales

En esta sección se especifican los materiales utilizados en este trabajo, agrupándolos según la naturaleza de éstos y no por el estudio en concreto para el que han sido empleados, lo cual se abordará en la siguiente sección.

### 1.1| Líneas celulares

La generación de las líneas de iPSCs PCCA (PCCA23-FiPS4F6) y PCCB (PCCB10-FiPS4F-1) se llevó a cabo mediante la reprogramación de fibroblastos primarios de dos pacientes AP con mutaciones en el gen *PCCA* o *PCCB*, respectivamente. Los pacientes se diagnosticaron en base a su sintomatología clínica y mediante el análisis bioquímico, enzimático y genético en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (España, Madrid).

La línea de iPSCs Control (N44SV.5) se obtuvo a través del Banco Nacional de Líneas Celulares del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, España, Madrid).

Las células iPSCs fueron crecidas sobre una monocapa de *feeders*, que son fibroblastos humanos comerciales (ATCC® CRL-2429™) irradiados para inactivarlos mitóticamente.

Para el empaquetado de partículas lentivirales se utilizaron células HEK293T, originadas a partir de la línea celular HEK293 que son células embrionarias de riñón humano transformadas mediante adenovirus.

Los fibroblastos de pacientes se obtuvieron mediante el consentimiento informado y autorizado de los padres y por el hospital que remitió las muestras. Toda la investigación llevada a cabo con

este material está autorizada por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, respetando los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos. Asimismo, el proyecto de investigación que engloba las actividades de esta Tesis Doctoral posee el informe favorable de la Comisión de Garantías para la Donación y Utilización de Células y Tejidos Humanos de la Comunidad Autónoma de Madrid.

## 1.2| Modelo murino

El modelo murino usado para el estudio de la fisiopatología de la AP, *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T), se trata de un modelo murino hipomorfo (Guenzel *et al.*, 2013) que, como se ha indicado en la introducción, carece del gen murino *Pcca* y contiene un transgén con el cDNA humano de *PCCA* con la mutación c.412G>A (p.A138T). Todos los experimentos se han realizado usando ratones *wild-type* de la cepa FVB y homocigotos *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T) generados mediante el cruce de machos heterocigotos *Pcca*<sup>+/-</sup>(A138T) con hembras heterocigotas y homocigotas *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T).

Los animales se mantuvieron en condiciones asépticas, con temperatura controlada y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas en el animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO, España, Madrid). Los ratones fueron agrupados en un máximo de 5 animales por jaula con agua y comida (Harlan Iberica) *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del CBMSO y autorizados por la Comunidad Autónoma de Madrid (PROEX22/14).

## 1.3| Reactivos y otros materiales

Las tablas 1 a 5 recogen la información relativa a los reactivos, kits, soluciones y tampones, vectores y medios de cultivo empleados en este trabajo.

**Tabla 1. Reactivos**

Reactivo/Producto	Casa comercial	Referencia	Uso
μ-Slide 8 Well	Ibidi	80826	Inmunofluorescencia
2-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	M3148	Extracción RNA, <i>Western Blot</i>
2-Mercaptoetanol	Gibco	31350-010	Cultivos celulares
5-bromo-4-cloro-3-indoil-beta-D-Galactósido (X-GAL)	Apollo	BIMB1001	Amplificación DNA plasmídico

Reactivo/Producto	Casa comercial	Referencia	Uso
Accutase™ Solution	Millipore	SCR005	Cultivos celulares
Ácido acético glacial	PanReac ApplyChem	141008.1212	<i>Western Blot</i>
Agarose D1 Low EEO	Conda	8010	PCR
Agua oxigenada	Sigma Aldrich	H1009	Citometría de flujo
Amersham ECL™ Blocking Agent	GE Healthcare Life Science	RPN2125	<i>Western Blot</i>
Ampicilina	Roche	70232322	Cultivos bacterianos
Antimycin A from Streptomyces sp.	Sigma Aldrich	A8674	<i>Seahorse</i>
B-27™ Minus Insulin	Thermo Fisher Scientific	A18956	Cultivos celulares
B-27™ supplement, serum free	Thermo Fisher Scientific	17504044	Cultivos celulares
bFGF Recombinant Human Protein	Gibco	PHG0021	Cultivos celulares
Biorad Protein Assay (Bradford)	BIORAD	500-006	Cuantificación proteínas
Bovine Serum Albumin, fatty acid free >96% (BSA)	Sigma-Aldrich	A6003	<i>Western Blot</i>
BrainPhys™ Neuronal Medium	Stem Cell Technologies	5790	Cultivos celulares
Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP)	Sigma Aldrich	C2920	<i>Seahorse</i>
CCD-1112Sk (ATCC® CRL-2429™)	ATCC	CRL-2429	Cultivos celulares
CHIR-99021 (CT99021)	SelleckChem	S2924	Cultivos celulares
Cloroformo	Merck	102445	Aislamiento RNA
Colcemid®	IrvineScientific	9311	Cariotipo
Complete mini EDTA free (Inhibidor proteasas)	Roche	11836170001	<i>Western Blot</i>
Cytosine β-D-arabinofuranoside hydrochloride (Ara-C)	Sigma Aldrich	C1768	Cultivos celulares
D-(+)-Galactosa	Sigma Aldrich	G0750	<i>Seahorse</i>
D-APV	Tocris	106	<i>Patch Clamp</i>
D-glucosa	Sigma Aldrich	G8769	<i>Seahorse</i>
Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H <sub>2</sub> DCFDA)	Invitrogen	D399	Citometría de Flujo
Dieta ratones suplementada con BCAA y Thr	Harlan Teklad	TD.140308	Tratamiento ratones
Dimetil sulfoxido (DMSO)	Sigma Aldrich	D2650	Varios usos
Ditiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	37291	<i>Western Blot</i>
DNA Molecular Weight Marker V	Roche	10821705001	PCR
dNTP Mix 10 mM	Invitrogen	18427-088	PCR
Donkey serum	Chemicon	S30	Varios usos
Doxycycline hyclate	Sigma Aldrich	D9891	Cultivos celulares
EmbryoMax® 0.1% Gelatin Solution	Millipore	ES-006-B	Cultivos celulares

Reactivo/Producto	Casa comercial	Referencia	Uso
Etanol	Merck	100983	Aislamiento RNA
Formalin solution, neutral buffered, 10%	Sigma Aldrich	HT501128	Fijación células
GE Healthcare HyClone™ Fetal Bovine Serum (U.S.), Standard	Fisher Scientific	11511851	Cultivos celulares
Gibco™ DMEM/F-12, GlutaMAX™ Supplement	Thermo Fisher Scientific	31331093	Cultivos celulares
Glicerol	Merck	104093	Glicerolados
GlutaMAX™ Supplement	Gibco	35050061	Cultivos celulares
Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor human (HBEGF)	Sigma Aldrich	E4643	Cultivos celulares
Higromicina	Thermo Fisher Scientific	10687010	Cultivos celulares
Human Albumin Grifols® 20% (HSA)	Grifols	3045361	Varios usos
iBlot™ Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Regular	Invitrogen	IB3010-01	<i>Western Blot</i>
Immolase™ Red DNA Polymerase	Bioline	BIO-21076	PCR
Ioduro de propidio	Sigma Aldrich	P4170	Citometría de Flujo
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	ATCC	30-2005	Cultivos celulares
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)	Sigma Aldrich	I5502-1G	Amplificación DNA plasmídico
KnockOut™ DMEM	Thermo Fisher Scientific	10829018	Cultivos celulares
KnockOut™ Serum Replacement	Gibco	10828	Cultivos celulares
L-Ácido ascórbico	Sigma Aldrich	A92902	Cultivos celulares
Laminin Mouse Protein, Natural	Thermo Fisher Scientific	23017015	Cultivos celulares
L-Glutamina	Gibco	25030-081	Cultivos celulares
LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific	L10119	Citometría de Flujo
MagNA Pure 96 DNA Tissue Lysis Buffer	Roche	4805160001	Aislamiento DNA
Matrigel® hESC-Qualified Matrix	Corning	354277	Cultivos celulares
MEM Non-Essential Amino Acid Solution (100X) (NEAA)	Lonza	BE13-114E	Cultivos celulares
MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator for live-cell imaging	Thermo Fisher Scientific	M36008	Citometría de Flujo
mTeSR™ Plus	Stem Cell Technologies	5825	Cultivos celulares
mTeSR™1	Stem Cell Technologies	85850	Cultivos celulares
N-2 supplement 100x	Thermo Fisher Scientific	17502048	Cultivos celulares
N6,2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (dbcAMP)	Sigma Aldrich	D0627	Cultivos celulares
N-Acetil-L-cisteína (NAC)	Sigma Aldrich	A7250	Cultivos celulares
NBQX	Tocris	373	<i>Patch Clamp</i>
Neurobasal™ Medium	Thermo Fisher Scientific	21103049	Cultivos celulares

Reactivo/Producto	Casa comercial	Referencia	Uso
Novex™ Sharp Pre-stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific	LC5800	Western Blot
NuPAGE™ 10% Bis-Tris Protein Gels	Thermo Fisher Scientific	NP0301BOX	Western Blot
NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels	Invitrogen	NP0323	Western Blot
NuPAGE™ LDS 4X sample buffer	Invitrogen	NP0008	Western Blot
NuPAGE™ MES SDS Running Buffer	Invitrogen	NP0002	Western Blot
Oligomycin from Streptomyces diastatochromogenes	Sigma Aldrich	O4876	Seahorse
One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli	Thermo Fisher Scientific	C404010	Amplificación DNA plasmídico
Película RX Agfa Ortho CP-G Plus	AGFA	EAS3W	Western Blot
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific	15140122	Cultivos celulares
Pertussis Toxin (PTX)	Tocris	3097	Patch Clamp
PhosSTOP™ (Inhibidor fosfatasas)	Sigma Aldrich	4906845001	Western Blot
Piruvato de sodio (NaPyr)	Thermo Fisher Scientific	11360070	Cultivos celulares
Poli-D-Lisina	Thermo Fisher Scientific	A3890401	Cultivos celulares
Polietilenglicol 400 (PEG 400)	Sigma Aldrich	8074850050	Tratamiento rapamicina
Ponceau	USB	32819	Western Blot
Puomicina	Thermo Fisher Scientific	A1113803	Cultivos celulares
Rapamicina >99%	LC Laboratories	R-5000	Tratamiento rapamicina
Recombinant human BMP4	Peprotech	120-05ET	Cultivos celulares
Recombinant human CNTF	Peprotech	450-13	Cultivos celulares
ReLeSR™	Stem Cell Technologies	5872	Cultivos celulares
Rotenona	Sigma Aldrich	R8875	Seahorse
Seahorse XF Base Medium	Agilent	102353-100	Seahorse
Seahorse XF Calibrant Solution	Agilent	100840-000	Seahorse
Seahorse XF24 Cell Culture Microplates	Agilent	100777-004	Seahorse
Seahorse XF96 Cell Culture Microplates	Agilent	101085-004	Seahorse
Sodium dodecyl sulfate ACS reagent (SDS)	Sigma Aldrich	L4390	Varios usos
Stemolecule™ Wnt Inhibitor IWP-4	StemGent	04-0036	Cultivos celulares
Suero Fetal Bovino (FBS)	ATCC	30_2021	Cultivos celulares
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensivity Substrate	Fisher Scientific	34096	Western Blot
Triton X-100	Roche	11332481001	Varios usos
TRIzol™ Reagent	Thermo Fisher Scientific	15596026	Aislamiento RNA
Trypan Blue 0,4%	Sigma-Aldrich	T8154	Cultivos celulares



Reactivo/Producto	Casa comercial	Referencia	Uso
Tween®20 Reagent	VWR	655205	<i>Western Blot</i>
Tween®80	Sigma Aldrich	P5188	Tratamiento rapamicina
XL1-Blue Supercompetent Cells	Stratagene	200236	Amplificación DNA plasmídico
Y-27632	Stem Cell Technologies	72304	Cultivos celulares

**Tabla 2. Kits**

Kit	Casa comercial	Referencia	Uso
Alkaline Phosphatase Blue Membrane Substrate Solution	Sigma Aldrich	AB0300-1KT	Detección actividad fosfatasa alcalina
AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit	Applied Biosystems	4322288	Análisis microsatélites
CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit	Thermo Fisher Scientific	A16517	Reprogramación fibroblastos
EZ DNA Methylation-Gold kit™	Zymo Research	D5005	Detección metilación DNA
FastStart™ Taq DNA Polymerase	Roche	12032945001	PCR
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	Roche	3730972001	Aislamiento DNA
miRCURY® LNA® RT Kit	Qiagen	339340	Retrotranscripción
miRCURY® LNA® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen	339345	PCR cuantitativa
miRCURY® RNA Isolation kit – Tissue	Qiagen	300111	Extracción miRNAs
NZY First-Strand cDNA Synthesis kit	NZY	MB12501	Retrotranscripción
OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit	Millipore	S7150	Detección proteínas carboniladas
PerfeCta SYBR® Green Fast Mix	QuantaBio	95071-250	PCR cuantitativa
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega	A1360	Clonación productos PCR
Qiagen Plasmid Purification Maxi Kit	Qiagen	12163	Aislamiento DNA plasmídico
RNeasy mini kit	Qiagen	74104	Extracción RNA
SALSA MLPA P278-C2-PCCA probemix	MRC-Holland	P278	Detección mutaciones paciente iPSCs PCCA
Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit	Agilent	103015-100	<i>Seahorse</i>
Wizard Plus Miniprep DNA purification system	Promega	A1330	Aislamiento DNA plasmídico

**Tabla 3. Soluciones y tampones**

Solución	Composición	Uso
NuPAGE MES SDS Running Buffer	NuPAGE™ MES 50 mM + Tris HCl 50 mM + SDS 0,1% + EDTA 1 mM pH 7,3	Western Blot
PBS	NaCl 137 mM + KCl 2,7 mM + Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 8 mM + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM	Varios usos
Rojo Ponceau	250 mg Ponceau + 2,5 ml ácido acético glacial + 250 ml H <sub>2</sub> O	Western Blot
Solución de bloqueo	TBS 1x + Tritón x100 0,3% + Donkey serum 3%	Inmunofluorescencia
Solución de bloqueo	TBS 1x + Tween®20 1% + leche 5%/BSA 3%	Western Blot
Solución de lavado	TBS 1X + Tween®20 1%	Western Blot
Solución de lavado	PBS 1x + Tween®20 0,1% + HSA 2% + EDTA 1 mM	Citometría de Flujo
Solución de permeabilización	PBS 1x + Tween®20 0,2%	Citometría de Flujo
Solución de resuspensión	PBS 1x + HSA 2%	Citometría de Flujo
Solución de deshibridación	PBS 1x + Tween®20 0,05% + Glicina 0,2 M	Western Blot
Solución extracelular	NaCl 129 mM + NaHCO <sub>3</sub> 21 mM + Glucosa 10 mM + KCl 3 mM + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,25 mM + MgSO <sub>4</sub> 2 mM + CaCl <sub>2</sub> 1,6 mM	Patch Clamp
Solución intracelular	CsCl 135 mM + HEPES 10 mM + NaCl 10 mM + MgATP 2 mM + NaGTP 0,3 mM + QX314 5 mM	Patch Clamp
Solución de lavado	TBS 1x + Tritón x100 0,1%	Inmunofluorescencia
TAE	Tris Acetato 40 mM + EDTA 2 mM	Electroforesis DNA
Tampón de lisis (células)	Tris HCl 10 mM pH 7,5 + NaCl 150 mM + Tritón x100 0,1% + Glicerol 10% + Inhibidor proteasas y fosfatasas 1x	Homogenización células
Tampón de lisis (tejidos)	Tris HCl 50 mM pH 8 + NaCl 100 mM + DTT 1 mM + Tritón x100 1% + SDS 0,1% + EDTA 0,4 mM + Inhibidor de proteasas y fosfatasas 1x	Homogenización tejidos ratón
TBS	Tris HCl 50 mM + NaCl 276 mM + KCl 54 mM pH 8	Varios usos
Tripsina	Tripsina 0,25% + EDTA 0,2%	Cultivos celulares

**Tabla 4. Vectores**

Vector	Casa Comercial	Referencia	Uso
DLX2-hygro	Addgene	97330	Diferenciación iPSCs a iNs
FUW-M2rtTA	Addgene	20342	Diferenciación iPSCs a iAs y iNs
pCMV-VSV-G	Addgene	8454	Diferenciación iPSCs a iAs y iNs
pMDLg/pRRE	Addgene	12251	Diferenciación iPSCs a iAs y iNs
pRSV-Rev	Addgene	12253	Diferenciación iPSCs a iAs y iNs
tetO.Nfib.Hygro	Addgene	117271	Diferenciación iPSCs a iAs
tetO.Sox9.Puro	Addgene	117269	Diferenciación iPSCs a iAs
TetO-Ascl1-puro	Addgene	97329	Diferenciación iPSCs a iNs

**Tabla 5. Medios de cultivo**

Medio de cultivo	Composición	Uso
Medio 1 iAs	Gibco™ DMEM/F-12 Glutamax + N-2 1x + FBS 10% + Doxiciclina 2 ng/ml	Primera semana diferenciación iPSCs a iAs
Medio 1 iCMs	RPMI + NEAA 100 μM + GlutaMAX™ 2 mM + β-mercaptoetanol 100 μM + B27-I™ 1x + antibióticos	Primera semana diferenciación iPSCs a iCMs
Medio 1 iNs	Gibco™ DMEM/F-12 GlutaMAX™ + N-2 1x + NEAA 100 μM + Doxiciclina 2 ng/ml	Primera semana diferenciación iPSCs a iNs
Medio 2 iAs	Neurobasal™ medium + FBS 10% + NEAA 100 μM + GlutaMAX™ 2 mM + B-27™ 1x + Doxiciclina 2 ng/ml + FGF 8 ng/ml + CNTF 5 ng/ml + BMP4 10 ng/ml	Primera semana diferenciación iPSCs a iAs
Medio 2 iCMs	RPMI + NEAA 100 μM + GlutaMAX™ 2 mM + β-mercaptoetanol 100 μM + B-27™ 1x + antibióticos	A partir de la segunda semana de diferenciación de iPSCs a iCMs
Medio 2 iNs	BrainPhys™ Neuronal Medium + NEAA 100 μM + N-2 1x + B-27™ 1x + Doxiciclina 2 ng/ml	A partir de la segunda semana de diferenciación de iPSCs a iNs
Medio 3 iAs	Gibco™ DMEM/F-12 Glutamax 50% + Neurobasal™ medium 50% + NaPyr 1 mM + GlutaMAX™ 1 mM + N-2 1x + Doxiciclina 2 ng/ml + NAC 5 μg/ml + HBEGF 5 ng/ml + CNTF 10 ng/ml + BMP4 10 ng/ml + dbcAMP 500 μg/ml	A partir de la segunda semana de diferenciación de iPSCs a iAs
Medio 3 iCMs	Medio 2 iCMs + FBS 10% + Y-27632 10 μM	Medio para plaquear iCMs
Medio congelación fibroblastos/HEK	FBS + DMSO 5%	Medio para la congelación de fibroblastos y HEK293T
Medio congelación iPSCs	Medio A (Medio iPSCs 50% + KnockOut™ Serum 50%) + Medio B frío (Medio iPSCs 80% + DMSO 20%)	Medio para la congelación de iPSCs
Medio Ectodermo	Neurobasal™ medium 50% + Gibco™ DMEM/F-12 50% + GlutaMAX™ 2 mM + B-27™ 1x + N-2 1x + antibióticos	Diferenciación de cuerpos embrionarios a ectodermo
Medio Endodermo	DMEM + FBS 20% + GlutaMAX™ 2 mM + β-mercaptoetanol 100 μM + antibióticos	Diferenciación de cuerpos embrionarios a endodermo
Medio Feeders	IMDM + FBS 10% + antibióticos	Cultivo de fibroblastos comerciales antes de ser irradiados
Medio Fibroblastos	DMEM + FBS HyClone™ 10% + GlutaMAX™ 2 mM + NEAA 100 μM + β-mercaptoetanol 100 μM + antibióticos	Cultivo de fibroblastos de pacientes antes de ser reprogramados
Medio HEK	DMEM + FBS 10% + GlutaMAX™ 2 mM + NEAA 100 μM + NaPyr 1 mM	Cultivo de HEK293T para producción de lentivirales
Medio iPSCs-Feeders	KnockOut™ DMEM + KnockOut™ serum 10% + GlutaMAX™ 2 mM + NEAA 100 μM + β-mercaptoetanol 100 μM + bFGF 10 ng/ml + HSA 0,5% + antibióticos	Cultivo de iPSCs creciendo sobre feeders
Medio Mesodermo	Gibco™ DMEM/F-12 + FBS 20% + GlutaMAX™ 2mM + β-mercaptoetanol 100 μM + ácido ascórbico 100 μM + antibióticos	Diferenciación de cuerpos embrionarios a mesodermo
Medio SH Galactosa	MEM (sin glucosa) + Galactosa 5,5 mM + Glutamina 2 mM + FBS 10% + antibióticos	<i>Seahorse</i> en iCMs
Medio SH Glucosa	MEM (glucosa 5,5 mM) + Glutamina 2 mM + FBS 10% + antibióticos	<i>Seahorse</i> en iCMs
Medio SH iAs y iNs	DMEM + GlutaMAX™ 2 mM + NaPyr 1 mM + Glucosa 0,9 g	<i>Seahorse</i> en iAs y iNs

## 1.4| Anticuerpos

Las siguientes tablas recogen toda la información referente a los anticuerpos utilizados en los distintos experimentos para la detección de proteínas específicas, tanto de los anticuerpos primarios (Tabla 6) como de los secundarios (Tabla 7).

**Tabla 6. Anticuerpos primarios**

Nombre	Especie, Descripción	Uso, Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-Actin, $\alpha$ -Smooth Muscle	Ratón, mAb	IF, 1:250 (iPSCs)/ 1:400 (iCMs)	Sigma Aldrich	A5228
Anti-ATP5G1/G2/G3	Conejo, mAb	Western Blot, 1:1.000	Abcam	ab180149
Anti-Cardiac Troponin T antibody (1C11)	Ratón, mAb	IF/FACs, 1:200	Sigma Aldrich	ab8295
Anti-Caspasa 3	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Cell Signaling	9662
Anti-Caspasa 9	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Cell Signaling	9504
Anti-Catalasa	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Abcam	ab16731
Anti-Ciclofilina D	Ratón, mAb	Western Blot, 1:1.000	Abcam	ab110324
Anti-Connexin 43 (H-150)	Conejo, pAb	IF, 1:1.000	Santa Cruz	sc-9059
Anti-Cytochrome C (Clone 6H2.B4)	Ratón, mAb	IF, 1:500	BD Biosciences	556432
Anti-EAAT1 (GLAST)	Conejo, pAb	IF, 1:100	Abcam	ab416
Anti-GAPDH [6C5]	Ratón, mAb	Western Blot, 1:5.000	Abcam	ab8245
Anti-GATA-4 (G-4)	Ratón, mAb	IF, 1:50	Santa Cruz	sc-25310
Anti-GFAP	Cobaya, pAb	IF, 1:500	Synaptic Systems	173 004
Anti-Glutatión peroxidasa 1	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Abcam	ab22604
Anti-JNK2	Conejo, pAb	Western Blot, 1:500	Cell Signaling	4672
Anti-LAMP1 (C54H11)	Conejo, mAb	Western Blot, 1:800	Cell Signaling	3243
Anti-LC3B	Conejo, pAb	Western Blot, 1:500	Cell Signaling	2775
Anti-MAP2	Pollo, pAb	IF, 1:5.000	Abcam	ab5392
Anti-MnSOD	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Enzo Life Science	ADI-SOD-110
Anti-NANOG	Cabra, pAb	IF, 1:25	R&D Systems	AF1997
Anti-OGG1	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Novus Biological	NB100-106
Anti-P-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Cell Signaling	9211
Anti-P-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Conejo, pAb	Western Blot, 1:500	Cell Signaling	9251
Anti-SOX2	Conejo, pAb	IF: 1:100	Thermo Fisher Scientific	PA1-16968
Anti-SSEA3	Rata, mAb	IF/FACs, 1:3/sin diluir	Hybridoma Bank	MC-631

Nombre	Especie, Descripción	Uso, Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-SSEA4	Ratón, mAb	IF/FACs, 1:3/sin diluir	Hybridoma Bank	MC-813-70
Anti-Total OXPHOS	Ratón, mAb	Western Blot, 1:1.000	Abcam	ab110413
Anti-Tubulin $\beta$ -III Tuj1	Conejo, pAb	IF, 1:500	Covance	MMS-435P
Anti-Vimentin	Ratón, mAb	IF, 1:250	Dako	M0725
Anti- $\alpha$ -Actinin (Sarcomeric)	Ratón, mAb	IF, 1:200	Sigma Aldrich	A7732
Anti- $\alpha$ -Fetoprotein	Conejo, pAb	IF, 1:400	Dako	A0008
GRP78/HSPA5	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Novus Biological	NBP1-06274
HERP	Ratón, mAb	Western Blot, 1:1.000	Enzo Life Science	BML-PW9705
Anti-S100 $\beta$	Conejo, pAb	IF, 1:400	Dako	Z0311
Anti-p38 $\alpha$ MAP Kinase (L53F8)	Ratón, mAb	Western Blot, 1:1.000	Cell Signaling	9228
Anti-TRA-1-60	Ratón, mAb	IF/FACs, 1:200/1:100	Millipore	MAB4360
Anti-p70 S6 Kinase	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Cell Signaling	9202
Anti-P-p70 S6 Kinase (Thr 389)	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Cell Signaling	9205
Anti-TRA-1-81	Ratón, mAb	IF/FACs, 1:200/1:100	R&D Systems	MAB4381
Anti-Oct-3/4 (C-10)	Ratón, mAb	IF, 1:50	Santa Cruz	sc-5279
Anti-Grp75/MOT (9F8)	Ratón, mAb	Western Blot, 1:1.000	Abcam	ab171089
Anti-4E-BP1	Conejo, mAb	Western Blot, 1:1.000	Cell Signaling	9644
Anti-P-4E-BP1 (Ser65)	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Cell Signaling	9451
Sigma Receptor (F-5)	Ratón, mAb	Western Blot, 1:1.000	Santa Cruz	sc-166392
MFN2 (M03)	Ratón, mAb	Western Blot, 1:1.000	Abcam	H00009927-M03
Anti-P-S6 Ribosomal Protein (Ser 240/244)	Conejo, pAb	Western Blot, 1:1.000	Cell Signaling	2215
Anti-S6 Ribosomal Protein (5G10)	Conejo, mAb	Western Blot, 1:1.000	Cell Signaling	2217
Anti-PCCA (D-5)	Ratón, mAb	Western Blot, 1:250	Santa Cruz	sc-374341

FACs: citometría de flujo; IF: inmunofluorescencia; mAb: anticuerpo monoclonal; pAb: anticuerpo policlonal

**Tabla 7. Anticuerpos secundarios**

Nombre	Especie	Uso, Dilución	Casa comercial	Referencia
Alexa 488 anti-Guinea Pig IgG	Cabra	IF, 1:500	Thermo Fisher Scientific	A-11073
Alexa 488 anti-Rabbit IgG	Mono	IF, 1:200	Thermo Fisher Scientific	A-31572
Alexa 488 anti-Rabbit IgG	Mono	IF, 1:200	Thermo Fisher Scientific	A-21206
Alexa 488 anti-Rat IgM	Cabra	IF, 1:200	Thermo Fisher Scientific	A-21212
Alexa 555 anti-Mouse IgG	Mono	IF, 1:200	Thermo Fisher Scientific	A-31570
Alexa 555 anti-Mouse IgG	Mono	IF, 1:200	Thermo Fisher Scientific	A-31570
Alexa 555 anti-Mouse IgM Cy3	Mono	IF, 1:200	Jackson	715-165-140
Alexa 647 anti-Goat IgG	Mono	IF, 1:200	Thermo Fisher Scientific	A-21447
Alexa 647 anti-Mouse IgM	Cabra	IF/FACs, 1:200/1:750	Thermo Fisher Scientific	A-21238
Anti-mouse IgG, HRP-linked	Caballo	<i>Western Blot</i> , 1/2.000	Cell Signaling	7076
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cabra	<i>Western Blot</i> , 1/5.000	Cell Signaling	7074
DAPI, Dihydrochloride	-	IF, 1:10.000	Merck	268298
Hoechst 33342 Solution	-	IF, 1:1.000	Sigma Aldrich	62249
Phalloidin-TRITC	-	IF, 1:200	Sigma Aldrich	P1951

FACs: citometría de flujo; IF: inmunofluorescencia

## 1.5 | Oligonucleótidos

Las siguientes tablas contienen todos los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de DNA (**Tabla 8**) y miRNAs (**Tabla 9**).

**Tabla 8. Oligonucleótidos**

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Uso
<i>ACADM-F</i>	GCACAAAGAGCTTTGGATGAA	qRT-PCR
<i>ACADM-R</i>	CATAAATGATATTGCTTGGTGCTC	qRT-PCR
<i>ACADVL-F</i>	GGAAGCAAGCTTTGGATCAGT	qRT-PCR
<i>ACADVL-R</i>	GCTGTGATCTTCTCCTTCACG	qRT-PCR
<i>ACTA1-F</i>	GACAGCGCCAAGTGAAGC	qRT-PCR
<i>ACTA1-R</i>	CTTCGTCGCACATTGTGTCT	qRT-PCR
<i>ANKRD1-F</i>	GATCGAATTCCGTGATATGCT	qRT-PCR
<i>ANKRD1-R</i>	AAACATCCAGGTTTCCTCCA	qRT-PCR

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Uso
<i>CD36-F</i>	TGGAACAGAGGCTGACAACCTT	qRT-PCR
<i>CD36-R</i>	TTGATTTTGGATAGATATGGGATGC	qRT-PCR
<i>CPTIA-F</i>	AGTTCTCTTGCCCTGAGACG	qRT-PCR
<i>CPTIA-R</i>	CTTCCAGCCCAGCACAT	qRT-PCR
<i>CPTII-F</i>	TGACCAAAGAAGCAGCAATG	qRT-PCR
<i>CPTII-R</i>	GAGCTCAGGCAAGATGATCC	qRT-PCR
<i>CRIPTO-F</i>	CGGAACTGTGAGCACGATGT	qRT-PCR
<i>CRIPTO-R</i>	GGGCAGCCAGGTGTCATG	qRT-PCR
<i>Esrra-F</i>	CCTGGTCTGTGGGGATGT	qRT-PCR
<i>ESRRA-F</i>	GGCGGCAGAAGTACAAGC	qRT-PCR
<i>Esrra-R</i>	GGACAGCTGTACTCGATGCTC	qRT-PCR
<i>ESRRA-R</i>	ATTCAGTGGGGCTGCTGT	qRT-PCR
<i>EX4 (PCCA)</i>	AGAAGTGGCATCAACATCACTGTG	Genotipado ratones
<i>FBL-F</i>	CCTGCGTAATGGAGGACACT	qRT-PCR
<i>FBL-R</i>	ACTTCGGAGGCAAACACG	qRT-PCR
<i>FOS-F</i>	CTACCACTCACCCGCAGACT	qRT-PCR
<i>FOS-R</i>	AGGTCCGTGCAGAAGTCCT	qRT-PCR
<i>Gapdh - F</i>	AGCTGAACGGGAAGCTCACT	qRT-PCR
<i>Gapdh - R</i>	GCTTCACCACCTTCTTGATGTC	qRT-PCR
<i>GAPDH-F</i>	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	qRT-PCR
<i>GAPDH-R</i>	AGGGATCTCGCTCCTGGAA	qRT-PCR
<i>IVS2 (PCCA)</i>	CTAGAAAGTAAATGTTTACCAGAA	Genotipado ratones
<i>KLF4-F</i>	CGAACCCACACAGGTGAGAA	RT-PCR
<i>KLF4-R</i>	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC	RT-PCR
<i>KOS-F</i>	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC	RT-PCR
<i>KOS-R</i>	ACCTTGACAATCCTGATGTGG	RT-PCR
<i>MT-CYB-F</i>	CATCTTGCCCTTCATTATTGC	qRT-PCR
<i>MT-CYB-R</i>	GTTGTTTGATCCCGTTTCGT	qRT-PCR
<i>MT-ND5-F</i>	AAATCCATTGTCGCATCCA	qRT-PCR
<i>MT-ND5-R</i>	TTGGTCTAGGCACATGAATATTGT	qRT-PCR
<i>Mycop-F</i>	CGCCTGAGTACGTTTCGC	PCR detección micoplasma
<i>Mycop-F</i>	CGCCTGAGTACGTACGC	PCR detección micoplasma
<i>Mycop-F</i>	TGCCTGGGTAGTACATTTCGC	PCR detección micoplasma

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Uso
<i>Mycop-F</i>	TGCCTGAGTAGTACATTCGC	PCR detección micoplasma
<i>Mycop-F</i>	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC	PCR detección micoplasma
<i>Mycop-F</i>	CACCTGAGTAGTATGCTCGC	PCR detección micoplasma
<i>Mycop-F</i>	CGCCTGGGTAGTACATTCGC	PCR detección micoplasma
<i>Mycop-R</i>	GCGGTGTGTACAAGACCCGA	PCR detección micoplasma
<i>Mycop-R</i>	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	PCR detección micoplasma
<i>Mycop-R</i>	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	PCR detección micoplasma
<i>Myh6-F</i>	GGCACAGAAGATGCTGACAA	qRT-PCR
<i>MYH6-F</i>	CTTCAAGGCCAAGCTGTACG	qRT-PCR
<i>Myh6-R</i>	CTGCCCTTGGTGACATACT	qRT-PCR
<i>MYH6-R</i>	CGTGGCTTCTGGAAATTGTT	qRT-PCR
<i>Myh7-F</i>	ATCAATGCAACCCTGGAGAC	qRT-PCR
<i>MYH7-F</i>	TATCAAGGGGAAGCCTGAAG	qRT-PCR
<i>Myh7-R</i>	CGAACATGTGGTGGTTGAAG	qRT-PCR
<i>MYH7-R</i>	GCCAGCCAATGATGTTGTAG	qRT-PCR
<i>NANOG2-F</i>	GAGTTAAAGAGTTTTGTTTTTAAAAATT AT	PCR metilación promotor NANOG
<i>NANOG2-R</i>	TCCCAAATCTAATAATTTATCATATCTT TC	PCR metilación promotor NANOG
<i>NANOG-F</i>	ACAACTGGCCGAAGAATAGCA	qRT-PCR
<i>NANOG-R</i>	GGTTCCCAGTCGGGTTTAC	qRT-PCR
<i>NCL-F</i>	AGCCCTGGTGCTGACTTG	qRT-PCR
<i>NCL-R</i>	GGACATAATCCTCAGACCTGCTA	qRT-PCR
<i>Neo</i>	TGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCAT GGC	Genotipado ratones
<i>NPPA-F</i>	CAGGATGGACAGGATTGGAG	qRT-PCR
<i>NPPA-R</i>	TCCTCCCTGGCTGTTATCTTC	qRT-PCR
<i>Nppb-F</i>	AAGTCCTAGCCAGTCTCCAGA	qRT-PCR
<i>NPPB-F</i>	ACGAAGCCCCAAGATGGT	qRT-PCR
<i>Nppb-R</i>	GAGCTGTCTCTGGGCCATTTC	qRT-PCR
<i>NPPB-R</i>	CCTCTTAATGCCGCCTCA	qRT-PCR
<i>Nrf1-F</i>	TGGAGTCCAAGATGCTAATGG	qRT-PCR
<i>NRF1-F</i>	ATCAGCAAACGAAACACAG	qRT-PCR
<i>Nrf1-R</i>	GCGAGGCTGGTTACCACA	qRT-PCR
<i>NRF1-R</i>	CTACTGTTGCCCCGTACC	qRT-PCR
<i>OCT4/3-F</i>	ATTTGTTTTTTGGGTAGTTAAAGGT	PCR metilación promotor OCT4



Nombre	Secuencia 5' → 3'	Uso
<i>OCT4/3-R</i>	CCAACTATCTTCATCTTAATAACATCC	PCR metilación promotor OCT4
<i>OCT4-F</i>	GGAGGAAGCTGACAACAATGAAA	qRT-PCR
<i>OCT4-R</i>	GGCCTGCACGAGGGTTT	qRT-PCR
<i>PCCA</i> (exón 21)-F	TTGATGGACATTTGGGTTTTT	PCR
<i>PCCA</i> (exón 21)-R	AGCAGTAATGAAGCCAAGTTCA	PCR
<i>PCCB</i> (exones 11 y 12)-F	GGATGGCTGCTGAGGACAAA	PCR
<i>PCCB</i> (exones 11 y 12)-R	TCCCACCACGGCTATGCTGTAG	PCR
<i>POLRIA-F</i>	GGTTTCAGTTCCTGCCACAT	qRT-PCR
<i>POLRIA-R</i>	TGGATTCCATCAGAAGTTTAAAGAA	qRT-PCR
<i>Ppara-F</i>	CACGCATGTGAAGGCTGTAA	qRT-PCR
<i>PPARA-F</i>	GCACTGGAAGCTGGATGACAG	qRT-PCR
<i>Ppara-R</i>	GCTCCGATCACACTTGTCG	qRT-PCR
<i>PPARA-R</i>	TTTAGAAGGCCAGGACGATCT	qRT-PCR
<i>Ppard-F</i>	GTATGCGCATGGGACTCAC	qRT-PCR
<i>PPARD-F</i>	CACTGGGCATGTACACAA	qRT-PCR
<i>Ppard-R</i>	GTCTGAGCGCAGATGGACT	qRT-PCR
<i>PPARD-R</i>	GCTCCCCTCATTGTCAGTC	qRT-PCR
<i>PPARGCIA-F</i>	CGCAGTCACAACACTTACAAGC	qRT-PCR
<i>Ppargc-1a-F</i>	GAAAGGGCCAAACAGAGAGA	qRT-PCR
<i>PPARGCIA-R</i>	GGGGTCATTTGGTGACTCTG	qRT-PCR
<i>Ppargc-1a-R</i>	GTAAATCACACGGCGCTCTT	qRT-PCR
<i>PPARGC1B-F</i>	GGAGGAGCAACTCTATGCTGA	qRT-PCR
<i>Ppargc-1b-F</i>	CTCCAGTTCCGGCTCCTC	qRT-PCR
<i>PPARGC1B-R</i>	AGGTGGCCGAGTCAAAGTC	qRT-PCR
<i>Ppargc-1b-R</i>	CCCTCTGCTCACGTCTG	qRT-PCR
<i>Pparg-F</i>	CCACCAACTTCGGAATCAGCT	qRT-PCR
<i>PPARG-F</i>	GACAGGAAAGACAACAGACAAATC	qRT-PCR
<i>Pparg-R</i>	TTTGTGGATCCGGCAGTTAAGA	qRT-PCR
<i>PPARG-R</i>	GGGGTGATGTGTTTGAAGCTG	qRT-PCR
<i>RRN3-F</i>	AGGAAGGCGATGTAGATGTTTC	qRT-PCR
<i>RRN3-R</i>	TTTGCAAGGCTCTGTGACAT	qRT-PCR
<i>SERCA2-F</i>	ACCCACATTCGAGTTGGAAG	qRT-PCR
<i>SERCA2-R</i>	CCAACGAAGGTCAGATTGGT	qRT-PCR

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Uso
<i>SeV-F</i>	GGATCACTAGGTGATATCGAGC	RT-PCR
<i>SeV-R</i>	ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTA TC	RT-PCR
<i>SIRT7-F</i>	TGCATGAGCAGAAGCTGGT	qRT-PCR
<i>SIRT7-R</i>	AATGTACATGTTCCCGTGGAG	qRT-PCR
<i>SOX2-F</i>	TGCGAGCGCTGCACAT	qRT-PCR
<i>SOX2-R</i>	TCATGAGCGTCTTGGTTTTCC	qRT-PCR
<i>SP6</i>	CTAGCATTTAGGTGACACTATAG	Secuenciación DNA
<i>T7</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAG	Secuenciación DNA
<i>Tfam-F</i>	CAAAGGATGATTCGGCTCAG	qRT-PCR
<i>TFAM-F</i>	GAACAAC TACCCATATTTAAAGCTCA	qRT-PCR
<i>Tfam-R</i>	AAGCTGAATATATGCCTGCTTTTC	qRT-PCR
<i>TFAM-R</i>	GAATCAGGAAGTTCCTCCA	qRT-PCR
<i>TNNI3-F</i>	CAGTAGGCAGGAAGGCTCAG	qRT-PCR
<i>TNNI3-R</i>	CCTCAAGCAGGTGAAGAAGG	qRT-PCR
<i>UBTF-F</i>	AGCCAGAAGGAGCACTACAAA	qRT-PCR
<i>UBTF-R</i>	CCTGGGGAGACAGGCTCT	qRT-PCR
<i>UPS</i>	GGCAGCAAAGATGGTCTCAGGC	Genotipado ratones

qRT-PCR: PCR cuantitativa; RT-PCR: PCR transcriptasa reversa

**Tabla 9. miRNAs**

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Uso	Referencia	Casa comercial
hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	qRT-PCR	204783	Exiqon
hsa-miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	qRT-PCR	MS00003731	Exiqon
hsa-miR-133a-3p	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	qRT-PCR	204788	Exiqon
hsa-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCUUGUUC	qRT-PCR	204494	Exiqon
hsa-miR-208a-3p	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	qRT-PCR	205619	Exiqon
hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG	qRT-PCR	204719	Exiqon
hsa-miR-378-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	qRT-PCR	204179	Exiqon
hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	qRT-PCR	204488	Exiqon
hsa-miR-499-3p	AACAUCACAGCAAGUCUGUGCU	qRT-PCR	MS00031913	Exiqon
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	qRT-PCR	204486	Exiqon
hsa-miR-1a-3p	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	qRT-PCR	204344	Exiqon
hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	qRT-PCR	204772	Exiqon
hsa-miR-25-3p	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	qRT-PCR	204361	Exiqon

## 2. Métodos

En esta sección se detallarán los métodos, organizados según su finalidad, que se han llevado a cabo a lo largo de todo el trabajo.

### 2.1| Cultivos celulares

Todas las líneas fueron mantenidas en condiciones de cultivo estándar (atmósfera de humedad relativa del 95%, 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C de temperatura). La composición de los medios utilizados, junto al uso de los mismos, se puede encontrar en la **Tabla 5**.

#### 2.1.1. Reprogramación no integrativa de fibroblastos a iPSCs

Para la generación de nuevos modelos celulares de AP se reprogramaron fibroblastos de un paciente AP con defectos en el gen *PCCA* y de otro paciente con defectos en el gen *PCCB*.

##### Infección de los fibroblastos

Los fibroblastos de los pacientes se cultivaron bajo condiciones estándar en “Medio fibroblastos” y se reprogramaron siguiendo las instrucciones del proveedor del kit *CytoTune™ iPS 2.0 Sendai Reprogramming*. Brevemente, dos días antes, los fibroblastos se levantaron con tripsina y se sembraron 50.000 o 100.000 células/pocillo en una placa p6 y, el día 0, se infectaron con los virus Sendai codificantes para los 4 factores de Yamanaka (Takahashi y Yamanaka, 2006). Durante la primera semana, se cambió el medio diariamente usando el “Medio fibroblastos”. El día 7, se levantaron las células con tripsina y se plaquearon 50.000 células en una placa p100 sobre una monocapa de *feeders*. A partir de ese día, se cambió el medio diariamente con “Medio iPSCs-*feeders*”. Tras 2 o 3 semanas, colonias individuales se picaron manualmente, utilizando un método mecánico mediante una micropipeta *The Stripper®* (Origio) y capilares *Strip-ID* de 150 µm (Gynetics), a distintos pocillos de placas p6 con *feeders* para proceder al aislamiento y amplificación de los distintos clones. Después de su expansión, los distintos clones se picaron manualmente y se congelaron en “Medio congelación iPSC” para poder almacenarlos en nitrógeno líquido.

##### Generación *feeders*

Las iPSCs necesitan ser cultivadas sobre una monocapa de fibroblastos irradiados (*feeders*) que les proporcionan los nutrientes necesarios para su crecimiento. Para ello, fibroblastos humanos comerciales (*ATCC® CRL-2429™*) fueron cultivados bajo condiciones estándar en “Medio *feeders*” y, para inactivarlas mitóticamente, se levantaron con tripsina y se irradiaron a 80 Gy. Las *feeders* generadas se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior uso.

Para el crecimiento de las iPSCs sobre *feeders*, dos días antes de picar las colonias, se incubó la placa con gelatina *EmbryoMax*® 0.1% 1 hora a 37°C y, posteriormente, se plaquearon aproximadamente  $2 \times 10^6$  células *feeders* en una placa p100.

#### Adaptación y crecimiento iPSCs en Matrigel®

Las iPSCs pueden adaptarse al crecimiento sobre una matriz extracelular sin necesidad del soporte proporcionado por las *feeders*. Para ello, se realizaron tres pases manuales a una placa p60 recubierta previamente con *Matrigel*®, según las instrucciones del proveedor, con medio *mTeSR*™. Una vez adaptadas al crecimiento en *Matrigel*®, se expandieron utilizando métodos de pase enzimáticos (*Accutase*™) o químicos (*ReLeSR*™), y se sembraron en placas previamente recubiertas de *Matrigel*® en presencia de medio *mTeSR*™ suplementado con Y-27623 10 µM. Tras 24 horas se cambió el medio y se mantuvieron en cultivo con medio *mTeSR*™ mediante la realización de pases 1:4 o 1:5 cada 3 o 4 días.

### **2.1.2. Diferenciación iPSCs a las tres capas germinales**

Para la caracterización de las iPSCs PCCA y PCCB se comprobó su capacidad de diferenciación a las tres capas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo. Para ello, una semana antes se sembró una placa p100 con las iPSCs y, cuando estuvieron al 80% de confluencia, se levantaron las células con *Accutase*™, se resuspendieron en 12 ml de medio *mTeSR*™ y se sembraron 120 µl/pocillo de una placa p96 de fondo cónico no adherente. Para favorecer la formación de los cuerpos embrionarios (EBs), se centrifugó la placa a 900 g durante 10 minutos. Tras dos días, se recogieron con una pipeta los EBs de todos los pocillos y se plaquearon sobre una placa p60 con medio *mTeSR*™. Tras dos días, los EBs se recogieron con una pipeta y se sembraron 3-4 EBs por pocillo de placa *µ-Slide 8 well* (Ibidi) previamente recubierta con *Matrigel*®. Durante 3 semanas se cambió el medio cada 2-3 días con el medio específico de diferenciación a cada capa germinal (**Tabla 5**). Finalmente, se analizó la expresión de marcadores específicos de cada capa germinal por inmunofluorescencia siguiendo el protocolo detallado en el apartado 2.8.3.

### **2.1.3. Diferenciación iPSCs a iAs**

Para la diferenciación de iPSCs a iAs se siguió un protocolo previamente descrito (Canals *et al.*, 2018). El día -2 de la diferenciación, las iPSCs se levantaron con *Accutase*™ y se sembraron en una placa p6 cubierta de *Matrigel*® 200.000 y 400.000 células/pocillo en el caso de las iPSCs Control y PCCA, respectivamente, con medio *mTeSR*™ suplementado con Y-27632 10 µM. El día -1 se realizó la infección con 1 µl de cada lentivirus correspondiente (rTTA, NFIB y SOX9) en medio *mTeSR*™. El día -2 se realizó la inducción de los factores de transcripción mediante la adición de doxiciclina (2 ng/ml), que se añadió siempre al medio de cultivo a partir de ese

momento. Los días 1 y 2 se cambió el medio con “Medio 1 iAs” y, en los días siguientes, se combinó el medio “Medio 1 iAs” con el “Medio 2 iAs” en los siguientes porcentajes: 75%/25%, 50%/50%, 25%/75%, hasta llegar al 100% de “Medio 2 iAs” en el día 6. Además, se llevó a cabo la selección de las células infectadas por resistencia a los antibióticos puromicina (2 días a 1,25 µg/ml) e higromicina (5 días a 200 µg/ml). En los días 7-9 los iAs se levantaron con *Accutase*<sup>TM</sup> para sembrarlos en una nueva placa p6 cubierta de *Matrigel*<sup>®</sup> o PDL/laminina; se sembraron como cultivo único o en cocultivo junto a las iNs dependiendo del experimento que se fuera llevar a cabo. A partir del día siguiente, en el caso del cultivo único, se cambió la mitad del medio por “Medio 3 iAs” y, en el caso del cocultivo, por una mezcla de “Medio 2 iNs” y de “Medio 3 iAs”; en ambos casos el cambio de medio se realizó cada 2 o 3 días.

#### 2.1.4. Diferenciación iPSCs a iNs

Para la diferenciación de iPSCs a iNs GABAérgicas se siguió un protocolo previamente descrito (Yang, N. *et al.*, 2017). El día -2 de la diferenciación, las iPSCs se levantaron con *Accutase*<sup>TM</sup> y se sembraron en una placa p6 cubierta de *Matrigel*<sup>®</sup> 300.000 y 600.000 células/pocillo en el caso de las iPSCs Control y PCCA, respectivamente, con medio *mTeSR*<sup>TM</sup> suplementado con Y-27632 10 µM. El día -1, se realizó la infección con 1 µl de cada lentivirus correspondiente (rtTA, ASCL1 y DLX2) en medio *mTeSR*<sup>TM</sup> fresco. El día 0, se realizó la inducción de los factores de transcripción mediante la adición de doxiciclina (2 ng/ml), que se añadió siempre al medio de cultivo a partir de ese momento. Desde el día 1 al 4 se cambió el medio diariamente con el “Medio 1 iNs” llevando a cabo la selección de las células infectadas por resistencia a los antibióticos puromicina (2 días a 1,25 µg/ml) e higromicina (5 días a 200 µg/ml). A partir del día 5, y en adelante, el medio fue siempre suplementado con Ara-C 4 µM. En los días 7-9 las iNs se levantaron con *Accutase*<sup>TM</sup> para sembrarlas en una nueva placa p6 cubierta de *Matrigel*<sup>®</sup> o PDL/laminina; se sembraron como cultivo único o en cocultivo junto a los iAs dependiendo del experimento que se fuera llevar a cabo. A partir del día siguiente, en el caso del cultivo único, se cambió la mitad del medio por “Medio 2 iNs” y, en el caso del cocultivo, por una mezcla de “Medio 2 iNs” y de “Medio 3 iAs”; en ambos casos el cambio de medio se realizó cada 2 o 3 días.

#### 2.1.5. Diferenciación iPSCs a iCMs

Para la diferenciación de iPSCs a iCMs se siguió un protocolo previamente descrito (Lian *et al.*, 2013). El día -3 de la diferenciación, las iPSCs se levantaron con *Accutase*<sup>TM</sup> y se sembraron en una placa p12 cubierta previamente con *Matrigel*<sup>®</sup>: 500.000 células/pocillo en el caso de las iPSCs Control y 1 millón de células para las PCCA y PCCB, con medio *mTeSR*<sup>TM</sup> suplementado con Y-27632 10 µM. Los dos días siguientes se les cambió el medio con *mTeSR*<sup>TM</sup>. El día 0 de la diferenciación se llevó a cabo la activación de la vía canónica de Wnt utilizando el “Medio 1

iCMs” suplementado con CHIR99021 12  $\mu\text{M}$  para PCCA y Control, y 9  $\mu\text{M}$  para PCCB. A las 24 horas exactas se cambió el medio por “Medio 1 iCMs” fresco. El día 3 se llevó cabo la inhibición de la vía canónica de Wnt utilizando el “Medio 1 iCMs” suplementado con IWP-4 2,5 mM. A las 48 horas se les cambió el medio por “Medio 1 iCMs” fresco. A partir del día 7, se les cambió el medio por “Medio 2 iCMs” cada 2-3 días, hasta el momento de realizar los experimentos, aproximadamente, en los días 25-32 de la diferenciación.

## 2.2| Técnicas de proteínas

### 2.2.1. Preparación de homogenados para *Western Blot*

Para la extracción de proteínas a partir de tejidos del ratón, los animales se sacrificaron en una cámara de  $\text{CO}_2$  y, posteriormente, los tejidos seleccionados se extrajeron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Aproximadamente 50 mg de tejido se homogenizaron con 200-500  $\mu\text{l}$  de “Tampón de lisis (tejidos)” mediante el homogenizador *Qiagen TissueLyser II* (3 rondas de agitación de 90 segundos a 20 Hz) o *T-25 digital Ultra-Turrax™, IKA®* (10 pases de 10 segundos). Posteriormente, los lisados se centrifugaron a velocidad máxima durante 30 minutos a 4°C, guardándose los sobrenadantes a -80°C hasta su utilización.

Para la extracción de proteínas a partir de células en cultivo, éstas se tripsinizaron y se centrifugaron 5 minutos a 300 g. El precipitado obtenido se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de “Tampón de lisis (células)”. A continuación, se realizaron 3 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido y un baño a 37°C para la ruptura de las células. Los lisados se centrifugaron a 16.000 g durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se guardaron a -80°C hasta su utilización.

### 2.2.2. *Western Blot*

Una vez cuantificada la cantidad de proteínas mediante la técnica de *Bradford* se prepararon las muestras: 50-75  $\mu\text{g}$  de proteína, 1  $\mu\text{l}$  de DTT 1 mM y tampón de carga *NuPAGE™ LDS Sample Buffer 4x*, hervidas durante 5 minutos a 95°C. En el caso de la detección de complejos de la CTE las muestras se calentaron a 50°C.

La separación electroforética se realizó en geles 4-12% *NuPAGE™ Precast Gels* o 10% *NuPAGE™ Precast Gels* utilizando el tampón de electroforesis recomendado. Para determinar los pesos moleculares de las proteínas se usó un marcador de peso molecular conocido *Novex™ Sharp Pre-stained Protein Standard*. Los geles se sometieron a un voltaje constante de 120 V durante 2 horas aproximadamente.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa con el sistema *iBlot™ Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Regular* durante siete minutos a 20 V. La

eficiencia de la transferencia se comprobó mediante la tinción de las membranas con el reactivo Rojo *Ponceau*.

Las membranas se incubaron al menos 1 hora en “Solución de bloqueo” y, a continuación, con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente (**Tabla 6**) toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 3 veces con “Solución de lavado” y se volvieron a incubar durante al menos hora y media con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 7**). Tras 3 lavados se procedió a la detección de las proteínas de interés por un método quimioluminiscente utilizando *Amersham ECL™* o *SuperSignal™ West Femto* en función de la intensidad de señal requerida.

Para la detección de más de una proteína en una misma membrana, tras la inmunodetección, las membranas se incubaron con “Tampón de deshibridación” 20 minutos a 80°C y después se continuó con el protocolo descrito anteriormente.

Las películas se escanearon y densitometraron utilizando el densitómetro *BioRad GS-900* (BioRad) y el programa informático *Image Lab*.

### **2.2.3. Detección de proteínas carboniladas en tejido de ratón**

Se partió de homogenados extraídos por el método descrito en el apartado 2.2.1 y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de *Bradford*. Para la detección de proteínas carboniladas en el modelo murino se siguió el protocolo del kit *OxyBlot protein™ oxidation detection*. Brevemente, el primer paso consistió en la derivatización de 15 µg de proteína mediante SDS y la solución 2, 4-dinitrofenilhidrazona (DNPH), seguido de incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se añadió el tampón de neutralización y el de carga y se utilizó todo el volumen de muestra para cargar un gel *NuPAGE™ 10% Bis-Tris Protein Gels* continuando con el protocolo descrito en el apartado 2.2.2. Los anticuerpos primario y secundario, incluidos en el kit, se utilizaron a una dilución 1:150 y 1:300, respectivamente.

## **2.3| Técnicas de ácidos nucleicos**

### **2.3.1. Aislamiento de ácidos nucleicos en células y tejidos**

El aislamiento de los ácidos nucleicos se realizó siguiendo el protocolo y las recomendaciones indicadas por los proveedores de cada uno de los kits utilizados. Para la extracción a partir de un cultivo celular las células se tripsinizaron, en el caso de los iCMs y los fibroblastos, o se levantaron con *Accutase™*, en el caso de las iPSCs, y se resuspendieron en medio de cultivo, se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g, se lavaron con PBS y se volvieron a centrifugar. Para la extracción a partir de tejidos del ratón, los animales se sacrificaron en una cámara de CO<sub>2</sub> y, posteriormente, los tejidos seleccionados se extrajeron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido.

Los distintos métodos utilizados para la extracción de ácidos nucleicos se recogen en la siguiente tabla:

**Tabla 10. Métodos de aislamiento de ácidos nucleicos**

Muestra de partida	Tipo ácido nucleico	Método de aislamiento	Uso
Líneas celulares	gDNA	<i>MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I</i>	Identificación mutaciones, análisis STRs y metilación
Cola de ratón	gDNA	NaOH 50 mM a 95°C y Tris-HCl 1 M pH 8	Genotipado ratones
Tejido de ratón	RNA	<i>RNeasy mini kit</i>	qRT-PCR
Líneas celulares	RNA	Método de <i>TRIzol</i> <sup>TM</sup>	qRT-PCR
Líneas celulares/Tejido de ratón	miRNA	<i>miRCURY<sup>TM</sup> RNA Isolation kit – Tissue</i>	qRT-PCR
Cultivo bacteriano	DNA plasmídico	<i>Wizard Plus Miniprep DNA purification/ Qiagen Plasmid Purification Maxi Kit</i>	Amplificación plásmidos

gDNA: DNA genómico; miRNA: microRNA; qRT-PCR: PCR cuantitativa; STRs: microsatélites

### 2.3.2. Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo en un espectrofotómetro *NanoDrop*<sup>TM</sup> 1000 (Thermo Scientific) teniendo en cuenta la relación  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ . El análisis del tamaño de los fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio en cubetas de desarrollo horizontal acopladas a una fuente de energía con tampón de electroforesis TAE. Tras la electroforesis, el tamaño de las bandas se obtuvo por comparación con las bandas de marcadores de peso molecular conocido mediante un transiluminador acoplado a una cámara.

### 2.3.3. Amplificación de DNA

Para la amplificación de DNA se utilizó un protocolo de PCR estándar (Mullis *et al.*, 1986) teniendo en cuenta la longitud del amplicón y la temperatura de *melting* de los oligonucleótidos utilizados en cada caso (Tabla 8). Se amplificaron entre 250-500 ng de DNA utilizando la polimerasa *FastStart Taq DNA polymerase* en un termociclador *Veriti® Thermal Cycler* (Applied Biosystems). El diseño de los oligonucleótidos se realizó utilizando los programas informáticos *Exon Primer*, *Primer 3* y *Blast*.

Para el control de la contaminación de los cultivos celulares por micoplasmas se usó un protocolo estándar de PCR utilizando un mix de oligonucleótidos (Tabla 8) para la detección de diversas especies de micoplasma. Como control de PCR se utilizó un control interno cedido por la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ).



### 2.3.4. Secuenciación

El método de secuenciación que se ha utilizado es el de terminación de cadena de DNA por incorporación de dideoxinucleótidos trifosfato (Sanger *et al.*, 1977). Para ello, 300-500 ng de DNA se secuenciaron junto a oligonucleótidos específicos (**Tabla 8**) a una concentración de 5 mM, mediante el servicio de secuenciación de *Macrogen*. Las secuencias se analizaron mediante el programa *Chromas*.

### 2.3.5. qRT-PCR

Para la realización de la PCR cuantitativa (qRT-PCR), en primer lugar, se llevó a cabo la retrotranscripción de 750 ng de RNA siguiendo las recomendaciones de los kits *NZY First-Strand cDNA Synthesis kit* (para mRNAs) o *miRCURY® LNA® RT Kit* (para miRNAs). A continuación, el cDNA se amplificó mediante PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos para los mRNAs (**Tablas 8**) o miRNAs (**Tabla 9**) y los kits *PerfeCta SYBR® Green Fast Mix* (mRNAs) o *miRCURY® LNA® SYBR® Green PCR Kit* (miRNAs). La amplificación y el análisis se realizó en un equipo *LightCycler® 480* (Roche) y los datos fueron normalizados utilizando el gen de expresión constitutiva *Gapdh/GADPH* (mRNAs) y U6 snRNA y miR-423-3p (miRNAs). Los resultados se expresaron como el parámetro de cantidad relativa (RQ), que nos permite comparar la cantidad de RNA en los distintos extractos utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Schmittgen y Livak, 2008).

### 2.3.6. Metilación promotores *OCT4* y *NANOG*

Para la determinación de la activación de la expresión de los factores de pluripotencia *OCT4* y *NANOG* en las iPSCs se analizó el grado de metilación de las islas CpG de sus promotores. Para ello, 500 ng de gDNA fueron modificados con bisulfito sódico siguiendo las instrucciones del fabricante del kit *EZ DNA Methylation-Gold™*; mediante el cual las citosinas no metiladas se convirtieron en uracilos. El DNA modificado se amplificó por PCR utilizando la Taq polimerasa *Immolase™ Red DNA Polymerase* y unos oligonucleótidos específicos (**Tabla 8**) diseñados teniendo en cuenta las citosinas modificadas. El producto de PCR se clonó en el vector *pGEM®-T Easy Vector* siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación del plásmido se transformaron cepas *XLI-Blue Supercompetent Cells* mediante choque térmico y el DNA plasmídico se aisló usando el kit *Wizard Plus Miniprep DNA purification system*. La secuenciación se llevó a cabo por el servicio de *Macrogen* usando los oligonucleótidos T7 o SP6; se secuenciaron al menos 5 clones distintos por región amplificada para comprobar el grado de metilación de las islas CpG de cada promotor.

### 2.3.7. MLPA

El análisis de la presencia de la delección de los exones 17 y 18 del gen *PCCA* en las iPSCs *PCCA* se realizó mediante la técnica de amplificación de múltiples sondas dependientes de ligación (MLPA). Para ello se utilizaron unas sondas comerciales específicas para este gen, *SALSA® MLPA® Probemix P278-C2*, diseñadas para la detección de delecciones o duplicaciones en el gen *PCCA*. Este kit contiene 36 sondas MLPA para la amplificación de productos entre 142 y 436 pb y, además, 9 sondas de referencia que son usadas como controles internos que generan un producto menor a 120 pb. En el análisis se incluyeron muestras de un individuo sano que fueron usadas como control positivo. Los resultados se procesaron utilizando el software *Coffalyser*.

### 2.3.8. Cariotipo

Para la comprobación de la estabilidad genómica de las iPSCs generadas se realizó un estudio del cariotipo en células con más de 20 pases en cultivo. Las iPSCs crecidas sobre *Matrigel®* se trataron con 10 µg/ml de *Colcemid®* durante 90 minutos a 37°C y se levantaron con *Accutase™* para fijarse a continuación con fijador de Carnoy. Para poder observar las etapas celulares en metafase y las bandas G las células fijadas se colocaron sobre un cubreobjetos, se secaron y se tiñeron mediante tinción de Wright. Al menos 20 metafases fueron analizadas. El análisis de estas preparaciones se llevó a cabo en el Servicio de Citogenética del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (España, Madrid).

### 2.3.9. Análisis de microsatélites

Se comprobó que la huella genética de las iPSCs generadas coincidía con la de los fibroblastos de los pacientes analizando el número de repeticiones de los microsatélites (STRs), que son repeticiones en tándem de un conjunto de 2-7 nucleótidos que se encuentran en *loci* polimórficos del DNA. Para ello, se utilizó el kit *AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification*, con el que 1 ng de gDNA se amplificó por PCR para analizar el número de STRs de 16 *loci* específicos: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1P0, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA y el determinante de sexo Amelogenina.

El tamaño de los fragmentos fue analizado por electroforesis utilizando un *3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems). Los resultados se procesaron utilizando el software *GeneMapper® v4.0* en el Parque Científico de Madrid, Campus Moncloa (España, Madrid).

## 2.4| Generación de partículas lentivirales

Para la generación de las partículas lentivirales, necesarias en el proceso de diferenciación de iPSCs a iAs y iNs, primero se llevó a cabo la purificación y amplificación de los plásmidos de interés (**Tabla 4**). Para ello, se transformaron células competentes *One Shot™ TOP10* con 2 µl de cada plásmido mediante choque térmico (30 minutos a 4°C, 30 segundos a 42°C y 5 minutos en hielo). Posteriormente, se aisló el DNA plasmídico siguiendo las recomendaciones del proveedor del kit *Qiagen Plasmid Purification Maxi*.

Las células HEK293T se mantuvieron aproximadamente una semana bajo condiciones estándar de cultivo utilizando el “Medio HEK”. La transfección de los plásmidos empaquetadores y codificantes de las cápsidas virales, así como de los plásmidos de interés, se llevó a cabo mediante un protocolo basado en la adición de CaCl<sub>2</sub> para permeabilizar la membrana celular. 24 horas después de la transfección, se añadió “Medio HEK” fresco durante otras 24 horas. Pasado ese tiempo, se recogió el medio de cultivo y se filtró utilizando un filtro de 0,45 µm acoplado a una jeringuilla. Este medio se centrifugó a 20.000 g durante 2 horas a 4°C para conseguir la concentración de las partículas lentivirales. El *pellet* resultante se resuspendió en 100 µl de medio DMEM frío.

## 2.5| Tratamiento *in vivo* con dieta rica en BCAA y treonina

Se utilizaron ratones *wild-type* y *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T) de 1 mes de edad a los que se les cambió su dieta habitual por un pienso enriquecido en BCAA (isoleucina, valina y leucina) y treonina suministrado por los laboratorios Harlan Teklad. El tratamiento de estos ratones se llevó a cabo en la Clínica Mayo (EEUU, Rochester). La dieta se mantuvo hasta los 5 meses de edad, cuando los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub> e, inmediatamente, el hígado y corazón fueron extraídos, congelados en nitrógeno líquido y guardados a -80°C hasta su posterior envío a nuestro laboratorio.

## 2.6| Tratamiento *in vivo* con rapamicina

Para el tratamiento de los ratones con rapamicina se siguió un protocolo previamente descrito (McMullen *et al.*, 2004). Se utilizaron ratones *wild-type* y *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T) de 5 meses de edad que fueron inyectados intraperitonealmente con 2 mg/kg de rapamicina cada 24 horas durante 7 días. Las inyecciones se prepararon cada día diluidas en un tampón cuya composición era: PBS 90%, Tween® 80 5% y PEG 400 5%. Los pesos de los ratones fueron monitorizados durante todo el estudio.

Al octavo día, los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub> e, inmediatamente, el corazón fue extraído, congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80°C hasta su posterior utilización.

## 2.7| Citometría de flujo

### 2.7.1. Cuantificación del nivel de expresión de una proteína

Para la caracterización de iPSCs y iCMs se analizó el nivel de expresión de distintos marcadores específicos de linaje por citometría de flujo. Las células se tripsinizaron y se contaron para utilizar 500.000 células por cada condición. Las células se lavaron con PBS y se realizó la tinción de células muertas siguiendo las instrucciones del proveedor del *LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain*. Se lavaron con solución de resuspensión para eliminar los restos de la tinción y se fijaron con formalina al 10% durante 20 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo la permeabilización de las células durante 15 minutos, seguida de un lavado, para finalmente dejar incubando toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente (**Tabla 6**). Al día siguiente, se realizó otro lavado y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 7**) durante 30 minutos a 4°C. Se realizó un último lavado y, finalmente, se resuspendieron las células en 300 µl de solución de resuspensión.

Se usaron como controles de compensación: un control con las células sin tratar, un control positivo de células muertas (previa incubación con NaCl 4 M 30 minutos a 4°C), controles de los anticuerpos secundarios para tener en cuenta su inespecificidad y, cuando fue necesario, controles de cada uno de los fluoróforos por separado para evitar el cruce de canales.

Las células fueron analizadas en un equipo de citometría de flujo analítica *FACSCanto A* (Becton Dickinson) y los datos fueron procesados y analizados mediante el programa *FlowJo 6.4.1*.

### 2.7.2. Detección de ROS

Dos días antes del experimento se levantaron los iCMs con tripsina y se plaquearon en una placa p12 previamente recubierta de Matrigel® unas 300.000 células/pocillo utilizando el “Medio 3 iCMs”.

Sonda H<sub>2</sub>DCFDA: el día del experimento, el pocillo del control positivo se incubó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM durante 15 minutos a 37°C y, después, se hizo un lavado con PBS de todos los pocillos. Posteriormente, se procedió a la incubación con la sonda H<sub>2</sub>DCFDA a 5 µM durante 30 minutos a 37°C; en el pocillo del control de muertas se añadió además NaCl 4 M. Tras la incubación, se hicieron dos lavados con PBS y se levantaron las células con tripsina, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS. El marcaje de células muertas se hizo con yoduro de propidio.

Sonda MitoSox™: el día del experimento, el pocillo del control positivo se incubó con antimicina A 40  $\mu\text{M}$  durante 15 minutos a 37°C y después se hizo un lavado con PBS de todos los pocillos. Posteriormente, se procedió a la incubación con la sonda MitoSox™ a 5  $\mu\text{M}$  durante 30 minutos a 37°C. Tras la incubación, se hicieron dos lavados con PBS y se levantaron las células con tripsina, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS.

En ambos casos, las células fueron analizadas en un equipo de citometría de flujo analítica *FACSCanto A* (Becton Dickinson) y los datos fueron procesados mediante el programa informático *FlowJo 6.4.1*.

## 2.8| Microscopía óptica, electrónica y confocal

### 2.8.1. Microscopía óptica

Latido cardíaco: el latido espontáneo de los iCMs fue grabado en un microscopio invertido *Axiocvert200* (Zeiss) acoplado a una cámara sCMOS monocroma y con sistema de incubación (37°C, O<sub>2</sub> 21%, CO<sub>2</sub> 5%). Los vídeos se grabaron tomando una foto cada 33,26 milisegundos con un objetivo 20x; al menos se tomaron 10 vídeos de cada condición. El análisis de los datos se realizó con el programa *ImageJ*.

Detección actividad enzimática fosfatasa alcalina: la expresión de la fosfatasa alcalina placentaria se utilizó como marcador de pluripotencia de las iPSCs. Una semana antes del experimento se picaron manualmente colonias iPSCs a una placa p100 con *feeders*. La actividad fosfatasa alcalina se observó siguiendo las instrucciones del kit *Phosphatase Alkaline Blue Membrane Substrate Solution*. Brevemente, tras fijar las células con formalina al 10%, se incubó la placa a 64°C durante 20 minutos para inactivar el resto de fosfatasas y, posteriormente, se incubó unos minutos a temperatura ambiente en oscuridad con el reactivo comercial que, en presencia de la fosfatasa alcalina, precipita dando un color azulado a las colonias. Las imágenes fueron tomadas usando un microscopio *Axiocvert200* (Zeiss) en contraste de fases con un objetivo 10x.

### 2.8.2. Microscopía electrónica

Tres días antes del experimento, los iCMs se levantaron con tripsina y se plaquearon 1 millón de células en una placa p35 previamente recubierta de Matrigel® con “Medio 3 iCMs”. El día del experimento, se fijaron las células a la placa de cultivo incubando durante una 1 hora a temperatura ambiente con una mezcla de paraformaldehído 4% y glutaraldehído 2% en un tampón fosfato pH 7,4 y se tiñeron con una mezcla de tetróxido de osmio 1% y ferricianida potásica 1% en agua destilada durante 1 hora a 4°C. La muestra fue deshidratada con etanol y embebida en una resina epoxy EML-812 (TAAB Laboratories). Posteriormente, se separaron pequeñas partes de la resina

para cortar secciones ultrafinas (70 nm) que fueron recogidas en rejillas teñidas con uranil acetato y citrato. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio electrónico *Jeol JEM-1010* (JEOL) acoplado a una cámara digital *CMOS TemCam F416* (TVIPS).

### 2.8.3. Microscopía confocal

En primer lugar, las células se sembraron para cada experimento:

- Caracterización iPSCs: una semana antes se picaron 7-9 colonias sobre una monocapa de *feeders* en una placa *μ-Slide 8 Well* (Ibidi) y se mantuvieron durante esos 7 días en cultivo con “Medio iPSCs-*feeders*”
- Diferenciación de EBs a las 3 capas germinales: se utilizaron EBs que llevaban 3 semanas en cultivo con cada medio de diferenciación específico en una *μ-Slide 8 Well* (Ibidi) previamente recubierta con *Matrigel*®.
- Caracterización iCMs: tres días antes del experimento los iCMs se levantaron con tripsina y se plaquearon 50.000 células/pocillo en una placa *μ-Slide 8 Well* (Ibidi) previamente recubierta con *Matrigel*® con “Medio 3 iCMs”.
- Caracterización cultivo único iAs: en los días 7-9 de la diferenciación los iAs se levantaron con *Accutase*<sup>TM</sup> y se plaquearon 70.000 células/pocillo sobre una placa *μ-Plate 24 Well Black* (Ibidi) previamente recubierta de *Matrigel*®. La mitad del medio se cambió cada 2-3 días por “Medio 3 iAs” hasta el día 14-16 de la diferenciación.
- Caracterización cocultivo iAs y iNs: en los días 7-9 de la diferenciación, los iAs y iNs se levantaron con *Accutase*<sup>TM</sup> y se plaquearon 50.000 iAs y 100.000 iNs sobre cubreobjetos previamente recubiertos de PDL/laminina. La mitad del medio se cambió cada 2-3 días por una mezcla de “Medio 2 iNs” y “Medio 3 iAs” hasta el día 28-30 de diferenciación.

El día del experimento, las células se lavaron con PBS y se fijaron con formalina al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron y se incubaron en “Solución de bloqueo” durante al menos media hora. Los anticuerpos primarios, a sus diluciones correspondientes (**Tabla 6**), se incubaron toda la noche a 4°C. Se lavaron las células y los anticuerpos secundarios (**Tabla 7**) se incubaron durante 2 horas a 37°C y media hora a temperatura ambiente. Se lavaron las células y se llevó a cabo la tinción nuclear con DAPI o Hoechst siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal *LSM710* acoplado a un microscopio invertido *AxioObserver* (Zeiss) o en un microscopio invertido *Axiovert200* (Zeiss) acoplado a una cámara sCMOS monocroma.

Se usaron como controles de compensación: un control con las células sin tratar, controles de los anticuerpos secundarios para tener en cuenta su inespecificidad y, en caso necesario, controles de cada uno de los fluoróforos por separado para evitar el cruce de canales.

## 2.9| Evaluación propiedades electrofisiológicas iNs

Para el análisis de las propiedades electrofisiológicas de las iNs generadas se utilizaron cocultivos de 4 semanas de diferenciación. Para ello se utilizó la técnica de *whole-cell patch clamp* en dos grupos: iNs Control cocultivadas con iAs Control y iNs PCCA cocultivadas con iAs PCCA.

En los días 7-9 de la diferenciación los iAs y iNs se levantaron con *Accutase*<sup>TM</sup> y se plaquearon 50.000 iAs y 100.000 iNs sobre cubreobjetos previamente recubiertos de PDL/laminina en una placa p12. La mitad del medio se cambió cada 2-3 días por una mezcla de “Medio 2 iNs” y “Medio 3 iAs”.

Para la realización de las mediciones se utilizó un *EPC 10 USB Patch Clamp Amplifier* (Heka) utilizando *PatchMaster* (Heka) para la adquisición de datos. Durante el análisis las muestras fueron continuamente perfundidas con “Solución extracelular” carbonatada a 34°C. Para la medición de corrientes postsinápticas (PSCs) se utilizó una “Solución intracelular” rica en cesio y un voltaje fijado a -70 mV. Para el aislamiento de las PSCs GABAérgicas esta solución fue suplementada con los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA, APV (50  $\mu$ M) y NBQX (5  $\mu$ M), respectivamente. Además, se añadió el antagonista de receptores GABA, PTX (100  $\mu$ M), para inhibir las corrientes mediadas por GABA. El análisis de los datos fue llevado a cabo mediante los programas *FitMaster*, *IgorPro* y *NeuroMatic*.

## 2.10| Evaluación tasa consumo oxígeno

### 2.10.1. Tasa consumo oxígeno en iCMs

Para el análisis de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en los iCMs se utilizó el sistema *Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Agilent). 3 días antes del experimento, se plaquearon 60.000 iCMs en unas placas específicas *Seahorse XF24 Cell Culture Microplates* recubiertas de *Matrigel*<sup>®</sup> en un volumen total de 100  $\mu$ l en “Medio 3 iCMs”. Una hora después, se añadió 150  $\mu$ l más de medio sobre cada pocillo. Tras 48 horas, se cambió el medio por 250  $\mu$ l de “Medio SH Glucosa” o “Medio SH Galactosa” y se hidrató la placa de calibrado con *Seahorse XF Calibrant Solution* durante toda la noche a 37°C. Una hora antes del experimento se cambió el medio por 700  $\mu$ l de *Seahorse XF Base Medium* junto con piruvato de sodio 1 mM y glucosa o galactosa 5,5 mM según correspondiese.

Tras medir el consumo de oxígeno basal, se inyectaron secuencialmente 50  $\mu\text{l}$  de oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A a unas concentraciones finales de 2  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Para la normalización de los datos se cuantificó la cantidad de proteína en cada pocillo lisando las células en la misma placa mediante la incubación con “Tampón de lisis de (células)” durante 30 minutos a 4°C en agitación y, posteriormente, se cuantificó por el método de Bradford.

### **2.10.2. Tasa consumo de oxígeno en iAs y iNs**

Para el análisis de la OCR en los iAs y iNs se utilizó el sistema *Seahorse XF96e Extracellular Flux Analyzer* (Agilent). 10 días antes del experimento, se plaquearon 20.000 iAs y 70.000 iNs en unas placas específicas *Seahorse XF96 Cell Culture Microplates* recubiertas de *Matrigel*® en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de “Medio 3 iAs” o “Medio 2 iNs” según correspondiese. Se mantuvieron en cultivo cambiando el medio cada 2-3 días. Una hora antes del experimento, se cambió el medio por 200  $\mu\text{l}$  del “Medio SH iAs y iNs”.

Tras medir el consumo de oxígeno basal, se inyectaron secuencialmente 25  $\mu\text{l}$  de oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A a unas concentraciones finales de 4  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Para la normalización de los datos se cuantificó el número de células de cada pocillo mediante la tinción del núcleo, para lo cual las células fueron fijadas con formalina al 10% e incubadas con *Hoechst*.

## **2.11 | Cuantificación de propionilcarnitina**

La cuantificación de los niveles de propionilcarnitina en los iCMs se realizó mediante la técnica de espectrometría de masas en tándem con isótopos estables como ésteres de butilo. Para la preparación de las muestras se recogió 1 ml de medio de cultivo de los iCMs en día 30 de la diferenciación y se adicionó una mezcla de acilcarnitinas deuteradas de concentración conocida. Las proteínas se precipitaron con 500  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo y el sobrenadante se evaporó por corriente de nitrógeno. Al extracto seco se le añadió 50  $\mu\text{l}$  de butanol/HCl y se calentó 30 minutos a 60°C para la formación de los ésteres de butilo.

Los extractos se analizaron en un espectrómetro de tripe cuadrupolo API 2000 QTRAP (AB Sciex) acoplado a un HPLC 1100 (Agilent). Las acilcarnitinas se cuantificaron con el software *Chemoview*, a partir de las intensidades de sus estándares deuterados. El análisis de estas preparaciones se llevó a cabo en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (España, Madrid).



## 2.12 | Análisis estadístico

Todos los valores mostrados son valores promedio de  $n$  experimentos que se han llevado a cabo de forma independiente y con distintas muestras biológicas. La significancia estadística de las diferencias entre los grupos analizados se analizó mediante una prueba *t de Student* de dos colas o ANOVA seguida de la correspondiente prueba *post hoc* (*Tukey HSD* o *Games Howell post hoc test*) realizadas mediante el programa *IBM SPSS Statistics v25*. Las diferencias se consideraron significativas en función de los p-valores obtenidos: \* $<0,05$ , \*\* $<0,01$  y \*\*\* $<0,001$ .

# RESULTADOS



---

# Resultados

---

## Modelo murino de AP

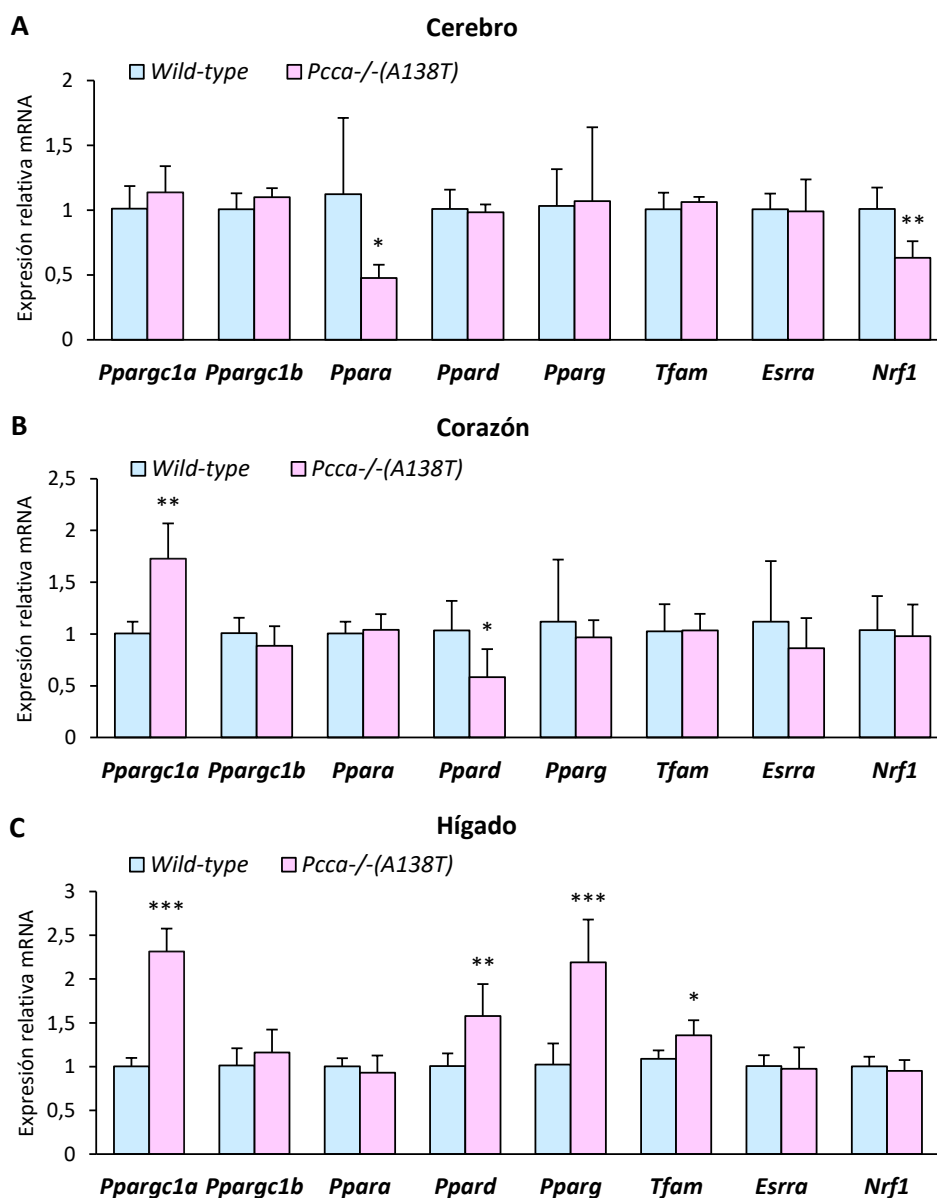
### 1. Estudio *in vivo* de vías que contribuyen a la fisiopatología de la AP

Estudios previos realizados por nuestro laboratorio y por otros investigadores, tanto en muestras de pacientes como en el modelo murino hipomorfo de AP *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T), sugieren que hay una disfunción mitocondrial secundaria y una alteración de la homeostasis redox que contribuyen a la fisiopatología de la AP (Wongkittichote *et al.*, 2017, Richard *et al.*, 2018, Haijes *et al.*, 2019a). En este trabajo, para completar la caracterización del modelo murino hipomorfo, se decidió analizar la biogénesis mitocondrial y estudiar algunos marcadores de muerte celular, así como seguir profundizando en el análisis de la homeostasis redox. Este estudio se ha centrado principalmente en cerebro y corazón por ser los tejidos más relevantes en la enfermedad y con más gasto energético y, en algunos casos, también se realizó en hígado por ser el tejido con mayor expresión de PCC.

#### 1.1| Evaluación de la biogénesis mitocondrial

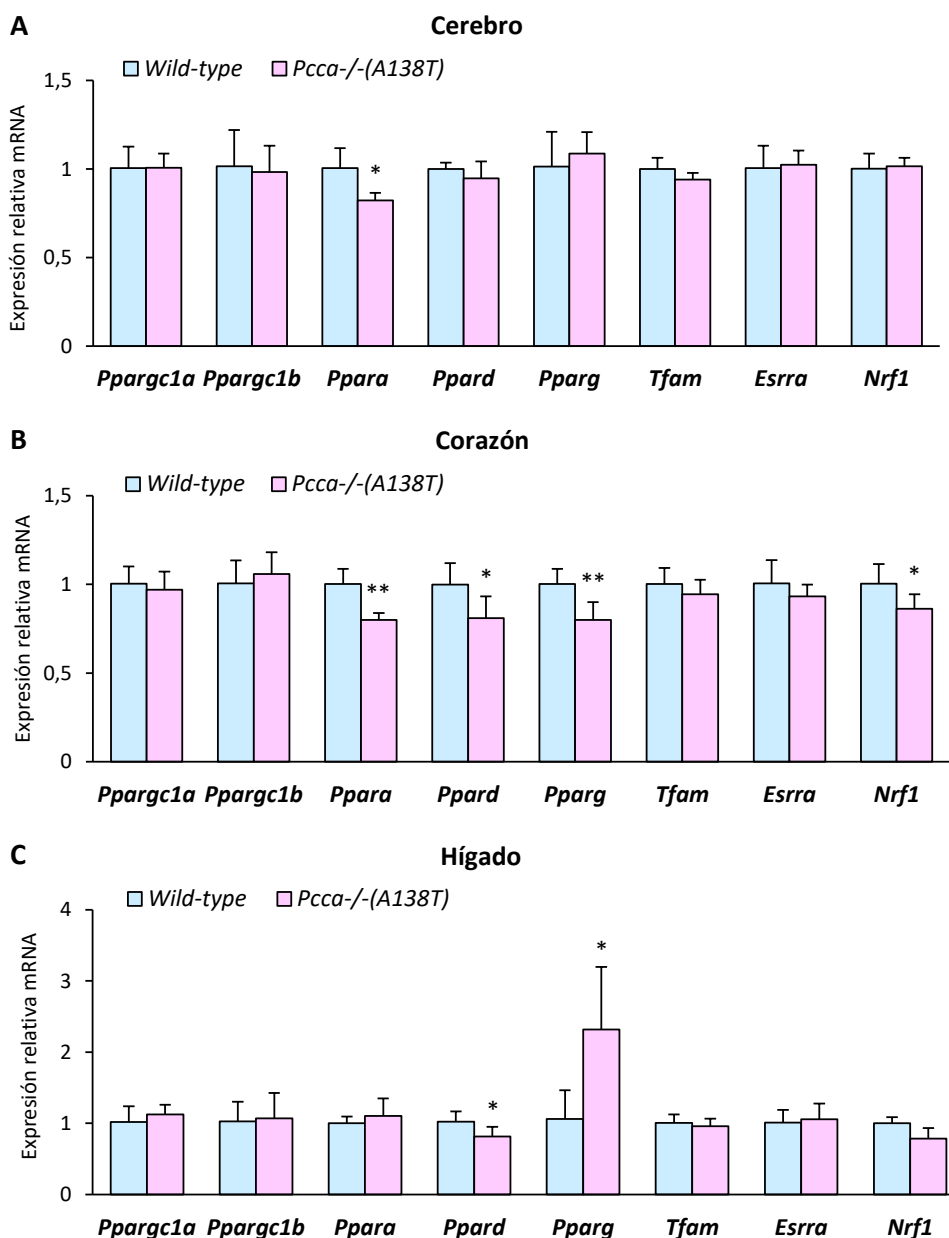
La depleción de mtDNA y la deficiencia en complejos de la CTE observados previamente en el modelo murino de AP (Gallego-Villar *et al.*, 2016) podrían ser debidos a una alteración de la biogénesis mitocondrial. Para evaluar esta hipótesis se analizaron los niveles de mRNA de varios genes implicados en este proceso como son los reguladores principales de esta vía, PGC-1 $\alpha$  (*Ppargc1a*) y PGC-1 $\beta$  (*Ppargc1b*), y otros factores implicados en esta ruta como PPAR- $\alpha$  (*Ppara*), PPAR- $\beta/\delta$  (*Ppard*), PPAR- $\gamma$  (*Pparg*), TFAM (*Tfam*), ERR- $\alpha$  (*Esrra*) y NRF1 (*Nrf1*) (Gureev *et al.*, 2019). El estudio se llevó a cabo en cerebro, corazón e hígado de ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) de 5 y 10 meses de edad.

El análisis de la expresión de estos genes en el cerebro de ratones de 5 meses de edad no mostró diferencias en la mayoría de los genes analizados, exceptuando *Ppara* y *Nrf1*, que mostraron una disminución significativa en su expresión en los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) en relación a los *wild-type* (**Figura 7A**). En el corazón, se observó un aumento de la expresión de *Ppargc1a* y una disminución de *Ppard* (**Figura 7B**), mientras que en el hígado se detectó un aumento significativo de la expresión en varios de los factores analizados (*Ppargc1a*, *Ppard*, *Pparg* y *Tfam*) en el modelo murino hipomorfo de AP en comparación con el *wild-type* (**Figura 7C**).



**Figura 7.** Análisis de la expresión de marcadores de la biogénesis mitocondrial en ratones de 5 meses de edad. Análisis de la expresión mediante qRT-PCR de *Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Ppara*, *Ppard*, *Pparg*, *Tfam*, *Esrra* y *Nrf1* en cerebro (**panel A**), corazón (**panel B**) e hígado (**panel C**) de ratones *wild-type* (n=5) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=5) de 5 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa de cada factor respecto a la de *Gapdh*. Análisis estadístico *t* de Student (\**p*<0,05, \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0,001).

El análisis en ratones de 10 meses de edad mostró que en el cerebro se mantuvo la disminución de la expresión de *Ppara* en los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) en relación a los *wild-type* (**Figura 8A**). En el corazón se observó una disminución de la expresión de varios de estos factores (*Ppara*, *Ppard*, *Pparg* y *Nrf1*) (**Figura 8B**), mientras que en el hígado se mantuvo el aumento de la expresión de *Pparg* y se observó una disminución de *Ppard* en el modelo murino hipomorfo de AP en comparación con el *wild-type* (**Figura 8C**).



**Figura 8.** Análisis de la expresión de marcadores de la biogénesis mitocondrial en ratones de 10 meses de edad. Análisis de la expresión mediante qRT-PCR de *Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Ppara*, *Ppard*, *Pparg*, *Tfam*, *Esrra* y *Nrf1* en cerebro (**panel A**), corazón (**panel B**) e hígado (**panel C**) de ratones *wild-type* (n=5) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=5) de 10 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa de cada factor respecto a la de *Gapdh*. Análisis estadístico *t* de Student (\**p*<0,05, \*\**p*<0,01).

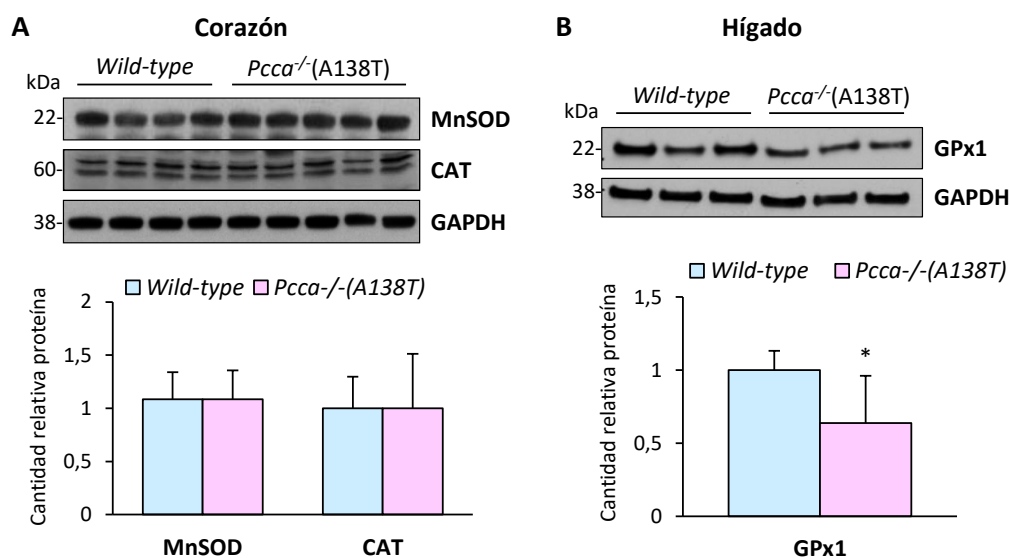
## 1.2| Evaluación de la homeostasis redox

En la AP, se postula que la acumulación de metabolitos tóxicos produce una inhibición de la fosforilación oxidativa, lo cual genera un aumento de la producción de ROS y del daño oxidativo a biomoléculas, que contribuye a la disfunción mitocondrial (Haijes *et al.*, 2019a). Con el fin de obtener una mayor comprensión de la alteración de la homeostasis redox que se produce en el modelo murino de AP se han analizado los niveles de algunas enzimas antioxidantes y se ha evaluado el daño oxidativo a proteínas.

### 1.2.1. Análisis de los niveles de enzimas antioxidantes

Un desbalance en la homeostasis redox puede ser debido al aumento de la producción de ROS o a una alteración de los niveles de enzimas antioxidantes, que son las encargadas de su detoxificación (Peoples *et al.*, 2019). Para completar el estudio sobre los niveles de enzimas antioxidantes realizados previamente en algunos tejidos del modelo murino de AP a distintas edades, en este trabajo se planteó el estudio de los niveles de las enzimas antioxidantes GPx1, MnSOD y CAT en ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) de 5 y 10 meses de edad.

El análisis de los niveles de las enzimas MnSOD y CAT en el corazón de ratones de 5 meses de edad no reveló diferencias significativas entre los dos modelos murinos (**Figura 9A**). El análisis de los niveles de la enzima GPx1 en el hígado de ratones de 10 meses de edad reveló una disminución de los niveles de esta proteína en los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) respecto a los *wild-type* (**Figura 9B**).

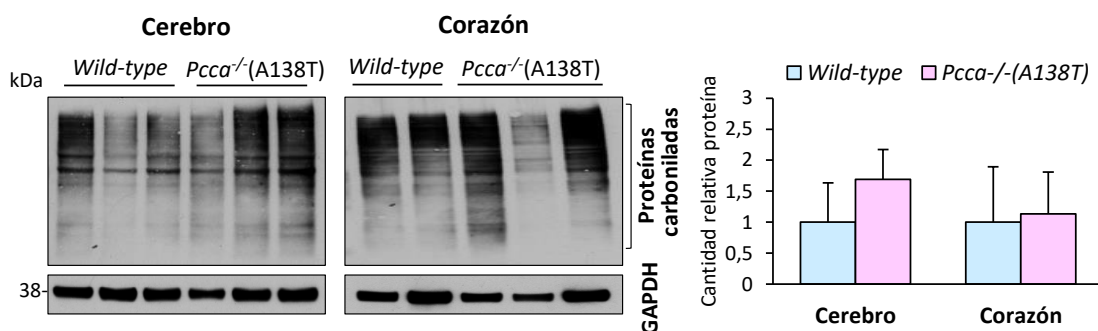


**Figura 9. Análisis de los niveles de enzimas antioxidantes.** Western Blot representativo para la detección de MnSOD y CAT en el corazón de ratones *wild-type* (n=8) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=10) de 5 meses de edad (**panel A**) y GPx1 en el hígado de ratones *wild-type* (n=6) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=6) de 10 meses de edad (**panel B**). El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de Student (\*p<0,05). Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

### 1.2.2. Análisis del daño oxidativo a proteínas

El aumento del estrés oxidativo detectado en el modelo murino de AP podría contribuir a la oxidación de biomoléculas, como las proteínas, produciendo la carbonilación de las mismas (Nissanka y Moraes, 2018). En este proceso, las cadenas laterales de distintos aminoácidos, especialmente lisina, arginina, prolina y treonina, son oxidadas en forma de cetonas y aldehídos que pueden reaccionar con la DNPH para formar unos complejos proteicos que pueden ser detectados mediante la técnica de *Western Blot* (Wehr y Levine, 2013).

Utilizando el método descrito anteriormente se realizó la inmunodetección de dichos productos derivatizados por DNPH como medida de la carbonilación de proteínas en el cerebro y corazón de ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) de 10 meses de edad. Como puede observarse en la **Figura 10** el análisis mostró que no había diferencias significativas en el contenido total de proteínas carboniladas en los tejidos analizados entre los ratones hipomorfos y los *wild-type*.



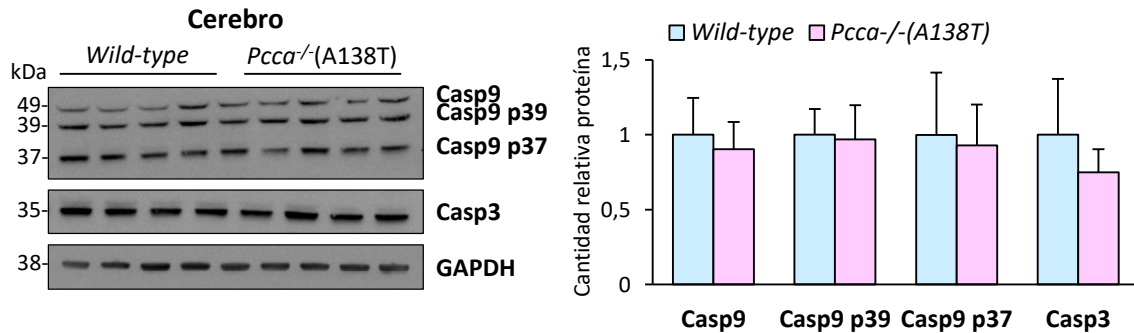
**Figura 10. Análisis del daño oxidativo a proteínas.** *Western Blot* representativo para la detección de proteínas carboniladas en el cerebro y corazón de ratones *wild-type* (n=5) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=5) de 10 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada carril respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de *Student*. Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

### 1.3| Evaluación de parámetros relacionados con la muerte celular

La alteración de la homeostasis redox y la disfunción mitocondrial son dos parámetros interrelacionados que pueden activar procesos de muerte celular como apoptosis o necrosis (Gudipaty *et al.*, 2018). Para analizar los mecanismos de muerte celular que podrían estar alterados en la AP se ha estudiado el nivel de algunas caspasas y de la CypD en el modelo murino de AP.

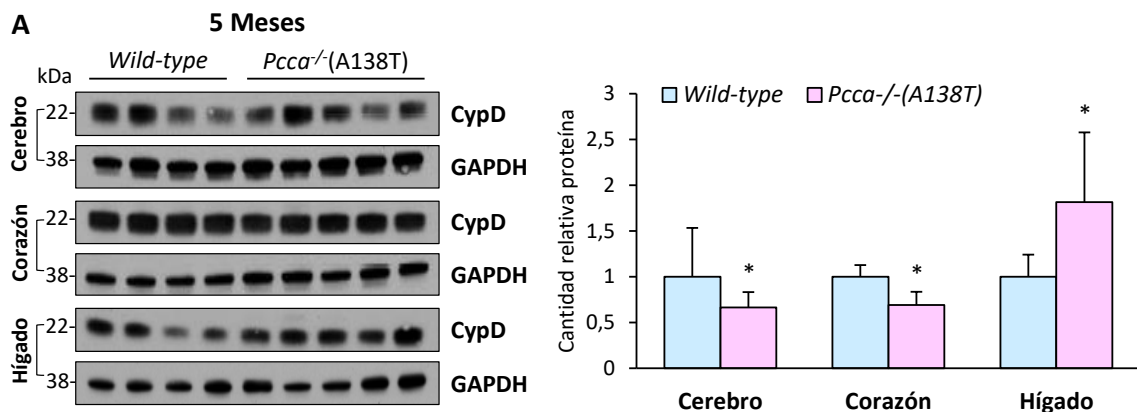
Datos previos del laboratorio han mostrado una disminución del nivel de caspasas en el corazón del modelo hipomorfo de AP lo que sugiere una reducción del proceso de apoptosis. Por ello, en este trabajo se propuso el estudio del nivel de la caspasa iniciadora Casp3 y la ejecutora Casp9 en el cerebro de ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) de 5 meses de edad. Los resultados mostraron que

no hay diferencias significativas en los niveles de Casp9 ni de sus formas procesadas (Casp9 p39 y Casp9 p37) ni de Casp3 entre ambos grupos. (**Figura 11**).

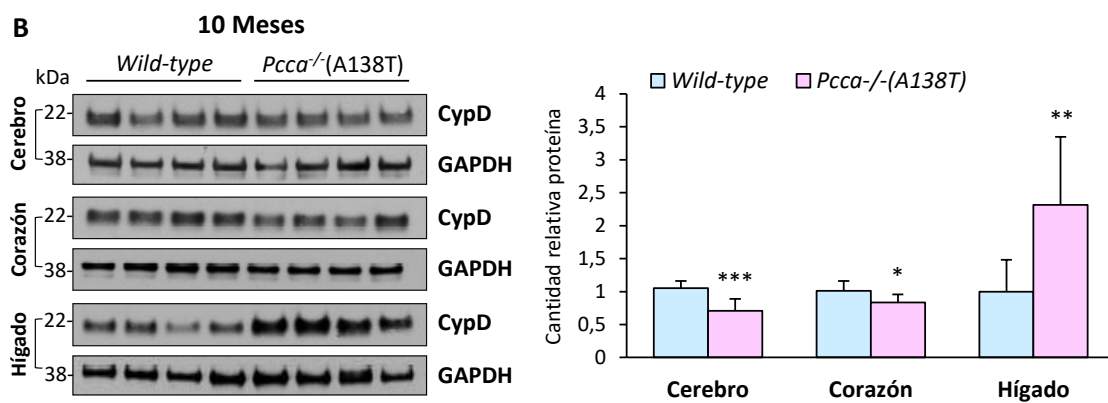


**Figura 11. Análisis de los niveles de las caspasas Casp9 y Casp3.** Western Blot representativo para la detección de Casp9 y sus formas procesadas y Casp3 en el cerebro de ratones *wild-type* (n=8) y *PCCA<sup>-/-</sup>*(A138T) (n=10) de 5 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de Student. Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

Debido al papel de la CypD en la regulación de la apertura del MPTP y en la iniciación de procesos de muerte celular (Porter y Beutner, 2018) se decidieron analizar sus niveles en ratones *wild-type* y *PCCA<sup>-/-</sup>*(A138T) de 5 y 10 meses de edad. En ratones de 5 meses de edad, los resultados mostraron una disminución significativa en los niveles de CypD en cerebro y corazón de los ratones *PCCA<sup>-/-</sup>*(A138T) frente a los *wild-type*, mientras que en el hígado se observó un aumento significativo de esta proteína (**Figura 12A**). En ratones de 10 meses de edad se mantuvo el mismo patrón que a los 5 meses en todos los tejidos analizados (**Figura 12B**).







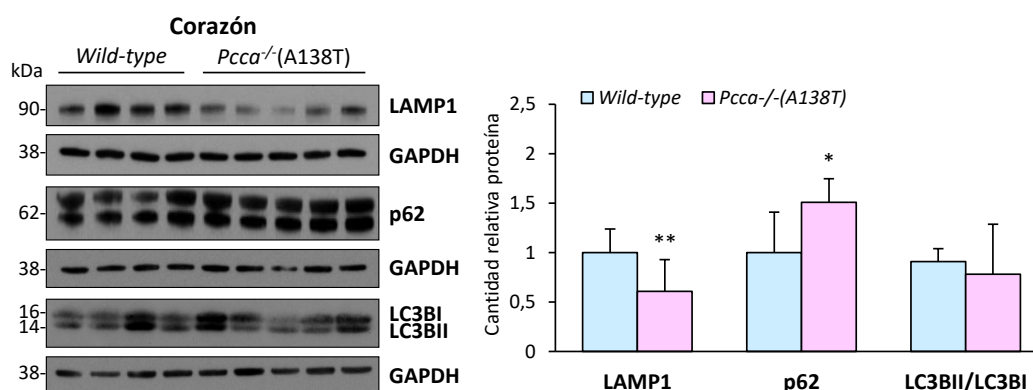
**Figura 12.** Análisis de los niveles del marcador de muerte celular CypD. Western Blot representativo para la detección de CypD en el cerebro, corazón e hígado de ratones *wild-type* (n=4) y *PCCA*<sup>-/(A138T)</sup> (n=5) de 5 meses de edad (**panel A**) y ratones *wild-type* (n=4) y *PCCA*<sup>-/(A138T)</sup> (n=4) de 10 meses de edad (**panel B**). El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de Student (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

## 2. Estudio *in vivo* del proceso de autofagia y evaluación del efecto del tratamiento con rapamicina

La autofagia es un mecanismo fisiológico que permite la degradación intracelular del contenido citoplásmico. Se trata de un proceso fundamental del remodelado cardíaco y su regulación está estrechamente relacionada con la correcta función cardíaca por lo que diversas patologías cursan con una alteración de este proceso (Sciarretta *et al.*, 2018a). Por todo ello, se decidió evaluar el proceso de la autofagia y sus vías de señalización, así como los miRNAs implicados en su regulación, en el tejido cardíaco del modelo murino de AP. Además, se evaluó el efecto del tratamiento con rapamicina, un conocido activador del proceso de autofagia.

### 2.1| Evaluación del proceso de autofagia

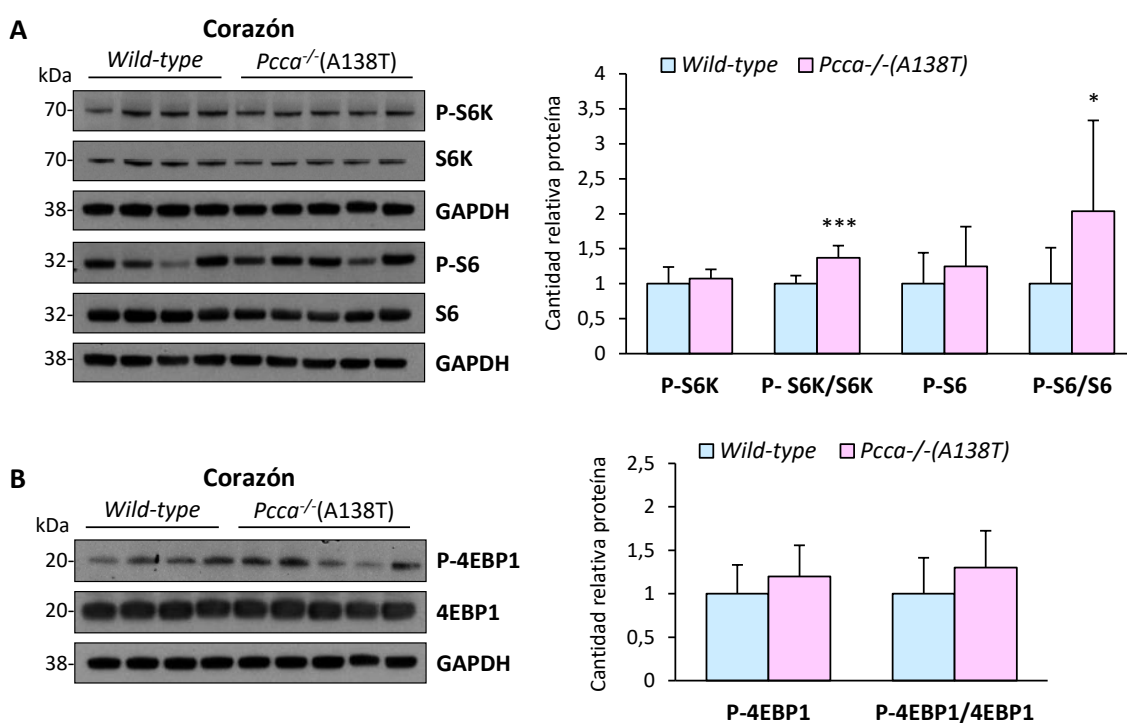
Para comprobar la implicación de la autofagia en el desarrollo de la patología cardíaca asociada a la AP se analizó el nivel de expresión de varias proteínas implicadas en este proceso, como son LC3B, LAMP1 y p62. La proteína LC3BI, en el proceso final de maduración del autofagosoma, forma un conjugado lipoilado llamado LC3BII y es la ratio LC3BII/I lo que se utiliza como un buen indicador del proceso autofágico. También pueden utilizarse otros marcadores como LAMP1, que es una proteína estructural que forma parte de la membrana de los lisosomas, y p62, que reconoce proteínas ubiquitinadas y las transporta hacia el autofagosoma con lo que se degrada durante la autofagia (Saha *et al.*, 2018). Como se observa en la **Figura 13** el análisis de estas proteínas en el corazón de ratones de 5 meses de edad mostró una disminución de los niveles de LAMP1 y un aumento de p62 en ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) frente a los *wild-type*, lo cual sugiere una disminución de la autofagia. La ratio LC3BII/I no mostró diferencias significativas.



**Figura 13.** Análisis de los niveles de proteínas implicadas en la autofagia. *Western Blot* representativo para la detección de LAMP1, p62 y LC3BII/I en el corazón de ratones *wild-type* (n=8) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=10) de 5 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de *Student* (\**p*<0,05, \*\**p*<0,01). Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

Tras comprobar que el proceso de la autofagia estaba alterado en el modelo murino hipomorfo de AP se procedió a la evaluación de una de las rutas de señalización que participa en su regulación, como es la vía de mTORC1, que tiene un efecto negativo sobre la activación de la autofagia (Tamargo-Gomez y Marino, 2018). Además, esta ruta está directamente relacionada con el remodelado cardíaco durante el desarrollo de cardiomiopatías ya que es la encargada de la activación de la biogénesis ribosomal y la síntesis de proteínas (Sciarretta *et al.*, 2018b). Para evaluar el estado de esta ruta se analizó el nivel de activación por fosforilación de varias proteínas en el corazón de ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) de 5 meses de edad.

Los resultados mostraron un aumento significativo de la ratio entre la forma fosforilada y la total de las proteínas S6K y S6 en ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) respecto a los *wild-type* (Figura 14A). Por otro lado, la proteína 4EBP1 no mostró diferencias significativas (Figura 14B).



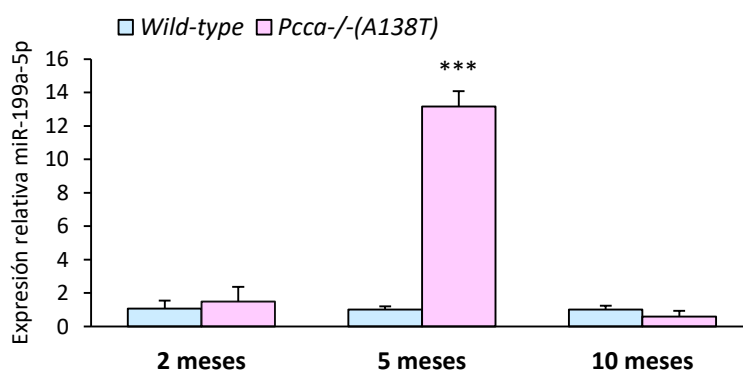
**Figura 14. Análisis de los niveles de proteínas implicadas en la ruta de mTORC1.** *Western Blot* representativo para la detección de las formas fosforiladas y totales de las proteínas S6K y S6 (**panel A**) y 4EBP1 (**panel B**) en el corazón de ratones *wild-type* (n=8) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=10) de 5 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de *Student* (\**p*<0,05, \*\*\**p*<0,001). Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

## 2.2 | Análisis de la expresión de la familia miR-199

Estudios previos en el modelo murino de AP han mostrado una desregulación de varios miRNAs en los distintos tejidos analizados (Rivera-Barahona *et al.*, 2017b). En el caso de las patologías

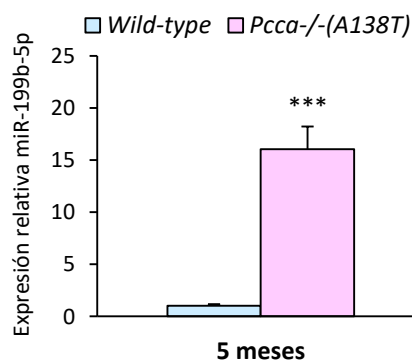
cardíacas, se ha estudiado en detalle la implicación que tienen las alteraciones de la expresión de miRNAs sobre la función cardíaca (Wojciechowska *et al.*, 2017). Uno de estos miRNAs es el miR-199a-5p que aparece aumentado en modelos de fallo cardíaco ya que promueve la activación de mTORC1 (Li, Z. *et al.*, 2017). Por ello, en este trabajo se ha querido comprobar si el aumento de la actividad de mTORC1 observado en el modelo murino de AP es debido, en parte, a la sobreexpresión de este miRNA analizando sus niveles en el corazón de ratones de 2, 5 y 10 meses de edad.

Como puede observarse en la **Figura 15** los resultados mostraron un patrón diferente de expresión del miR-199a-5p en el tejido cardíaco a distintas edades, siendo en ratones de 5 meses de edad donde se observó un aumento de hasta 14 veces en los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) respecto a los *wild-type*.



**Figura 15. Análisis de la expresión del miR-199a-5p.** Análisis de la expresión mediante qRT-PCR del miR-199a-5p en el corazón de ratones *wild-type* (n=5) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=5) de 2, 5 y 10 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa respecto a la de U6 y miR-423-3p. Análisis estadístico *t* de Student (\*\*\*)p<0,001).

Para completar el estudio sobre la familia del miR-199 se evaluó la expresión del miR-199b-5p, importante también en el remodelado cardíaco (Duygu *et al.*, 2017), en el corazón de ratones de 5 meses, ya que a esta edad se había observado el mayor aumento del miR-199a-5p y de otros miRNAs específicos de corazón analizados en nuestro laboratorio. Como puede observarse en la **Figura 16** la expresión del miRNA-199b-5p resultó aumentada hasta 17 veces en los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) frente a los *wild-type*.



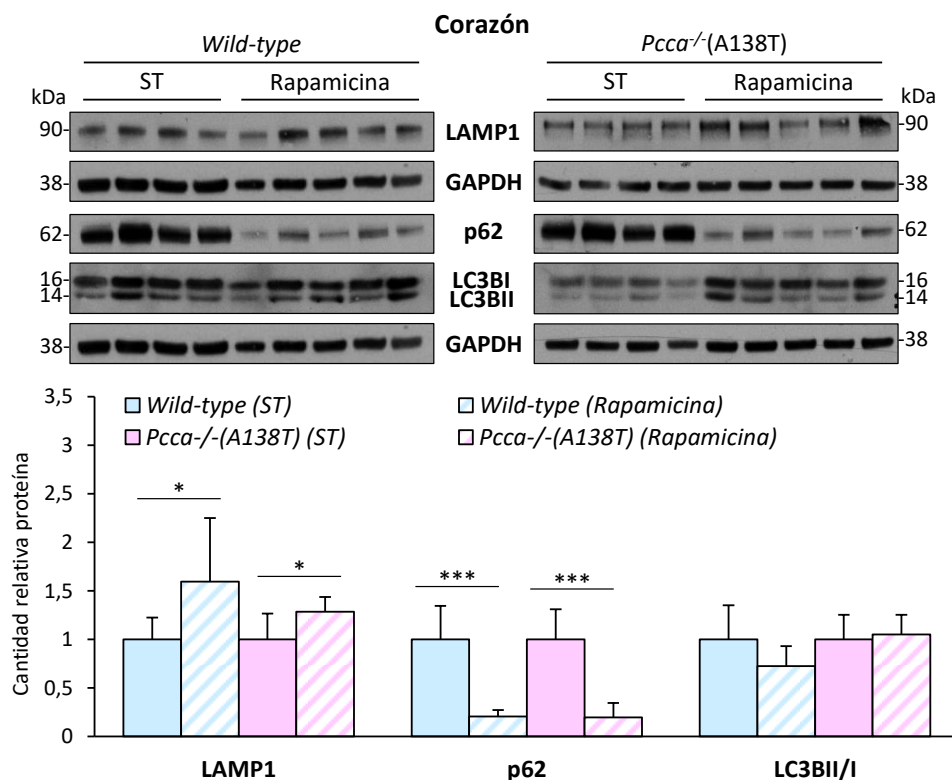
**Figura 16. Análisis de la expresión del miR-199b-5p.** Análisis de la expresión mediante qRT-PCR del miR-199b-5p en el corazón de ratones *wild-type* (n=5) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=5) de 5 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa respecto a la de U6 y miR-423-3p. Análisis estadístico *t* de Student (\*\*\*)p<0,001).

## 2.3| Evaluación del efecto del tratamiento con rapamicina

Estudios previos han demostrado que una inhibición parcial de mTORC1 mediante la rapamicina es un tratamiento eficaz para reducir la hipertrofia y la fibrosis y mejorar la función cardíaca en general (Sciarretta *et al.*, 2018b). Por este motivo, se decidió investigar si el tratamiento con este compuesto podría utilizarse *in vivo* como terapia adyuvante en la AP con el fin de revertir algunas de las alteraciones observadas en el corazón del modelo murino de la enfermedad. Para el estudio se dividieron aleatoriamente ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) de 5 meses de edad en dos grupos: sin tratar y tratados con rapamicina durante 7 días, siguiendo un protocolo descrito previamente (McMullen *et al.*, 2004). Su efecto fue evaluado mediante el análisis de los niveles de proteínas implicadas en la autofagia y en la vía de mTORC1 y de la expresión de marcadores de daño cardíaco.

### 2.3.1. Análisis de los niveles de proteínas implicadas en autofagia y en la vía de mTORC1

La evaluación de la autofagia se llevó a cabo mediante el análisis de los niveles de las proteínas LAMP1, p62 y LC3B en el corazón de ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) sin tratar y tratados con rapamicina. El tratamiento con rapamicina produjo un aumento de LAMP1 y una disminución de p62 significativos tanto en los ratones *wild-type* como en los *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T), reflejo de que el tratamiento fue efectivo produciendo un aumento del proceso de autofagia (**Figura 17**).



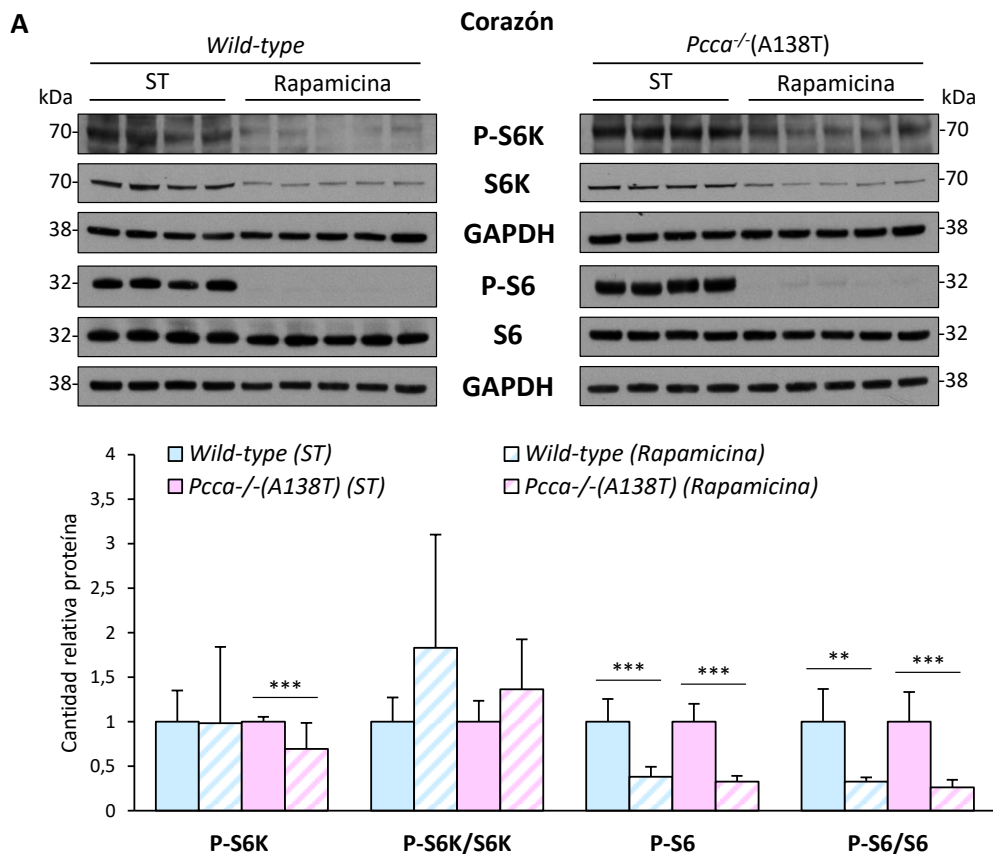
**Figura 17.** (Pie figura página siguiente)

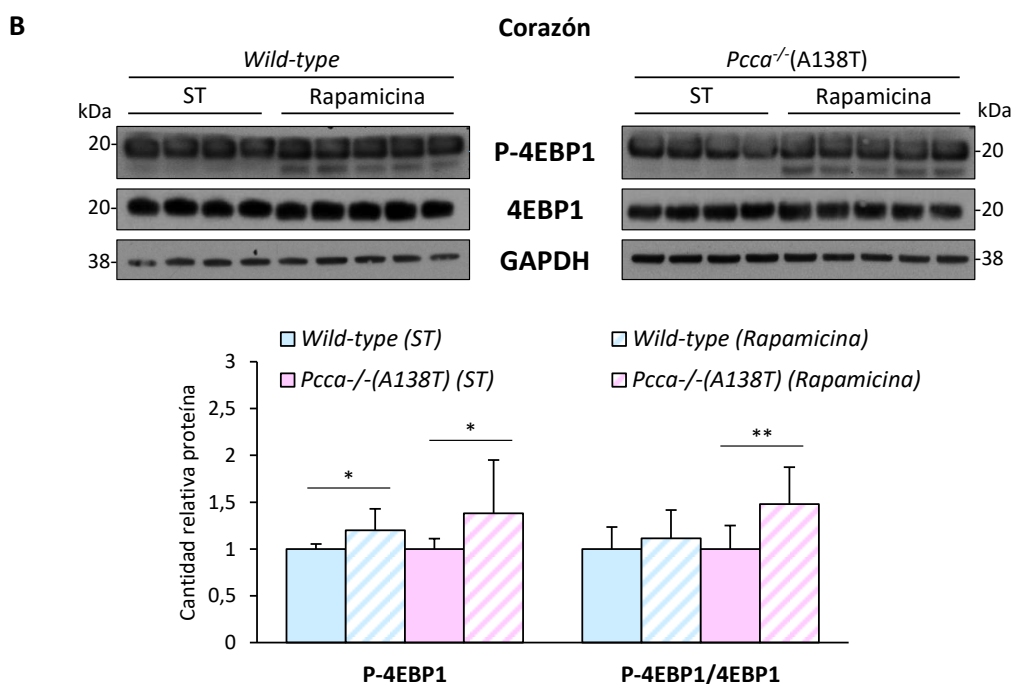
(Página anterior)

**Figura 17. Efecto del tratamiento de la rapamicina sobre los niveles de proteínas implicadas en la autofagia.**

Western Blot representativo para la detección de LAMP1, p62 y LC3BII/I en el corazón de ratones sin tratar [ST, *wild-type* (n=8) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=8)] y tratados con rapamicina [*wild-type* (n=10) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=10)] de 5 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de Student (\**p*<0,05, \*\*\**p*<0,001). Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

La evaluación del nivel de activación de la ruta de mTORC1 se llevó a cabo mediante el análisis de los niveles de las formas fosforiladas y totales de S6K, S6 y 4EBP1 en el corazón de ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) sin tratar y tratados con rapamicina. Los resultados mostraron que el tratamiento con rapamicina produjo una disminución significativa de los niveles de la forma fosforilada de S6K en los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T). Además, se detectó una disminución tanto de la forma fosforilada como de la ratio de la fosforilada frente a la total de S6 tanto en los ratones *wild-type* como los *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) tratados con rapamicina (**Figura 18A**). Por otro lado, en la **Figura 18B** podemos observar que los ratones *wild-type* tratados presentan un aumento de la forma fosforilada de 4EBP1 frente a los sin tratar mientras que los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) presentan un aumento tanto de la forma fosforilada como de la ratio de la fosforilada frente a la total respecto a los no tratados. En conjunto, todos los resultados indican que el tratamiento con rapamicina fue efectivo en la inhibición de la vía de mTORC1.



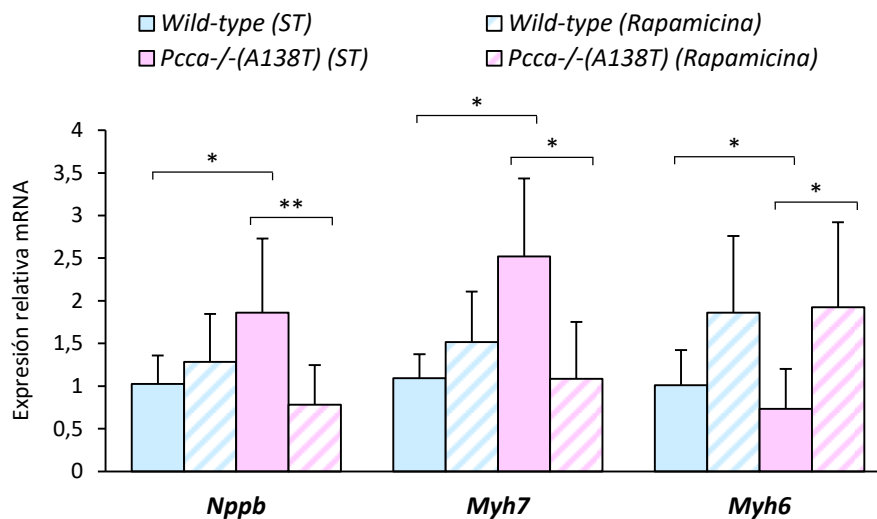


**Figura 18.** Efecto del tratamiento de la rapamicina sobre los niveles de proteínas implicados en la vía de **mTORC1**. *Western Blot* representativo para la detección de las formas fosforiladas y totales de S6K y S6 (**panel A**) y 4EBP1 (**panel B**) en el corazón de ratones sin tratar [ST, *wild-type* (n=8) y *PCCA<sup>-/-</sup>(A138T)* (n=8)] y tratados con rapamicina [*wild-type* (n=10) y *PCCA<sup>-/-</sup>(A138T)* (n=10)] de 5 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

### 2.3.2. Análisis de la expresión de marcadores de daño cardíaco

Estudios previos de nuestro laboratorio revelaron la presencia de marcadores de daño cardíaco en el corazón del modelo murino de AP. Por ello, para comprobar el efecto del tratamiento con rapamicina en un nivel más fisiológico, se analizó la expresión de los marcadores *Nppa*, *Myh7* y de la isoforma  $\alpha$  la de cadena pesada de la miosina ( $\alpha$ -MHC; *Myh6*) en el corazón de ratones de 5 meses de edad tratados y sin tratar.

En concordancia con lo observado en otros estudios, los ratones *PCCA<sup>-/-</sup>(A138T)* mostraron un aumento significativo de la expresión de los genes *Nppb* y *Myh7* y una disminución de *Myh6* frente a los *wild-type*, lo que indica presencia de daño cardíaco (Shih *et al.*, 2015). El tratamiento de rapamicina pudo revertir esta situación provocando una disminución significativa de la expresión de *Nppb* y *Myh7* y un aumento de *Myh6* en los ratones hipomorfos tratados frente a los sin tratar (**Figura 19**).



**Figura 19. Efecto del tratamiento de la rapamicina sobre el nivel de expresión de marcadores de daño cardíaco.** Análisis de la expresión mediante qRT-PCR de los marcadores de hipertrofia *Nppb*, *Myh7* y *Myh6* en corazón de ratones sin tratar [ST, *wild-type* (n=4) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=4)] y tratados con rapamicina [*wild-type* (n=4) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=4)] de 5 meses de edad. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa de cada factor respecto a la de *Gapdh*. Análisis estadístico ANOVA (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

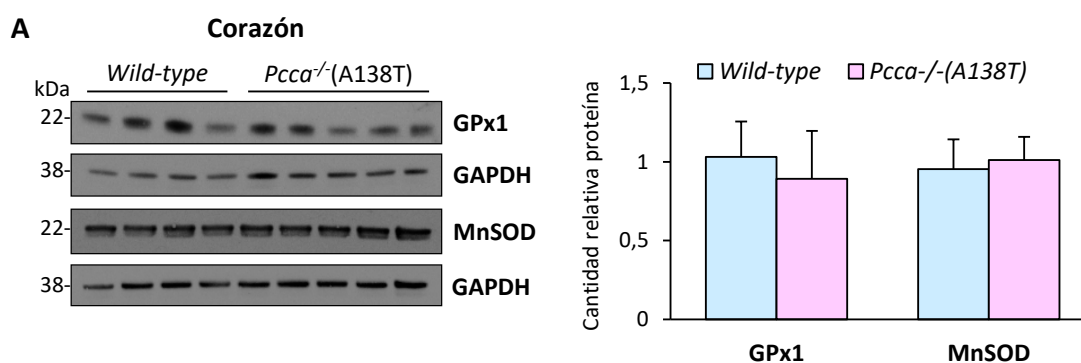


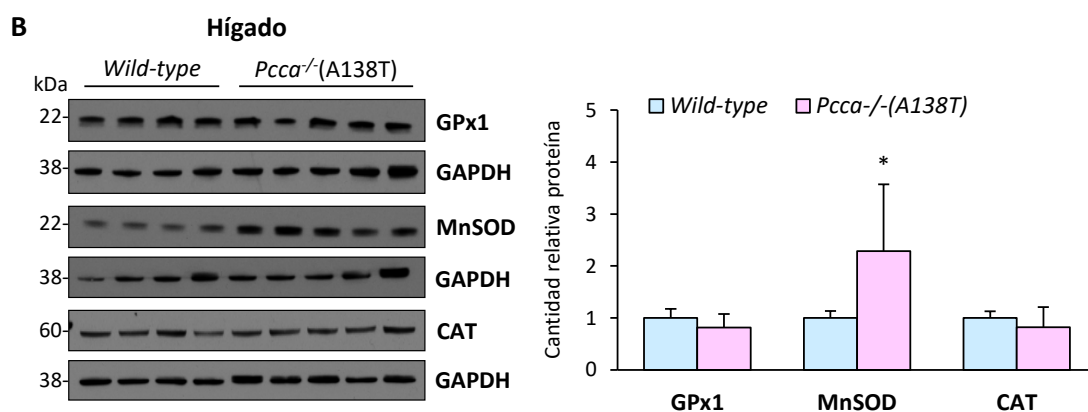
### 3. Estudio *in vivo* del efecto de una dieta rica en BCAA y treonina

El modelo murino utilizado en este trabajo consiste en un modelo hipomorfo que retiene un 2,2% de actividad PCC, presentando una afectación bioquímica y clínica moderadas, lo cual le permite sobrevivir hasta la edad adulta (Guenzel *et al.*, 2013). Como se ha mencionado anteriormente, la PCC es una enzima que participa, entre otros procesos, en el metabolismo de los BCAA isoleucina y valina, metionina y treonina (Wongkittichote *et al.*, 2017). Con objeto de generar un modelo más severo de la enfermedad se evaluó el efecto de una dieta rica en BCAA y treonina en el modelo murino hipomorfo de AP. Para el estudio, se seleccionaron aleatoriamente ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) de 1 mes de edad y se les mantuvo con esta dieta hasta los 5 meses de edad. Para comprobar su efecto se hizo una evaluación de la homeostasis redox analizando los niveles de proteínas antioxidantes y el daño oxidativo a proteínas y DNA y, además, se analizaron los niveles de los complejos de la CTE en corazón e hígado.

#### 3.1| Evaluación de la homeostasis redox

El efecto de la dieta rica en BCAA y treonina sobre las enzimas antioxidantes se comprobó mediante el análisis de los niveles de las proteínas GPx1, MnSOD y CAT en ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) de 5 meses de edad. En el corazón no se observaron diferencias en los niveles de GPx1 y MnSOD entre los ratones *wild-type* y los *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (**Figura 20A**). En el hígado se observó un aumento significativo en los niveles de MnSOD en los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) frente a los *wild-type*, mientras que no se observaron diferencias en los niveles de GPx1 y CAT entre ambos grupos (**Figura 20B**).

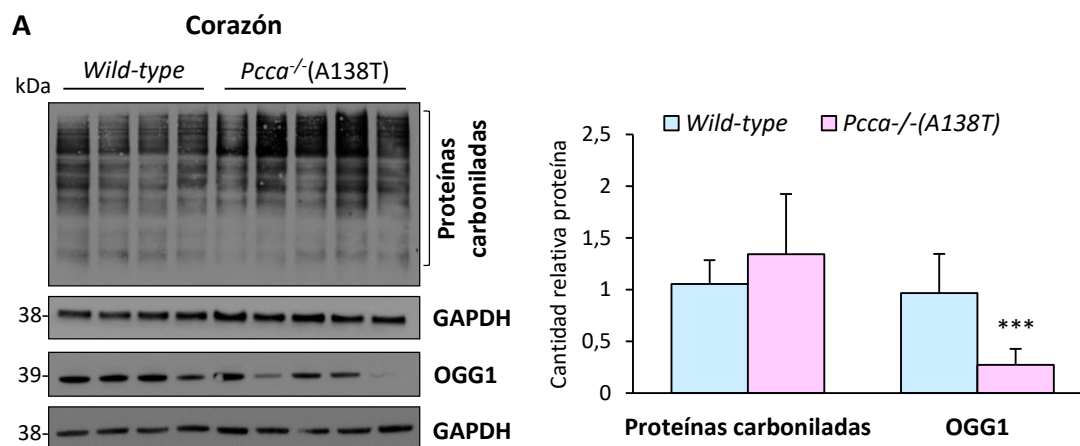


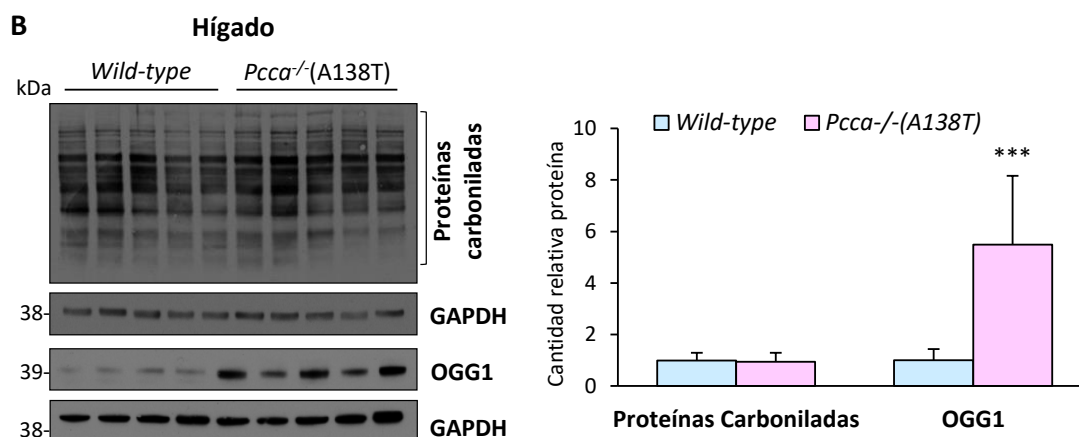


**Figura 20.** Efecto de la dieta rica en BCAA y treonina sobre los niveles de enzimas antioxidantes. *Western Blot* representativo para la detección de GPx1 y MnSOD en el corazón de ratones *wild-type* (n=9) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=8) de 5 meses de edad tratados con esta dieta (**panel A**) y GPx1, MnSOD y CAT en el hígado de ratones *wild-type* (n=8) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=10) de 5 meses de edad tratados con esta dieta (**panel B**). El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de *Student* (\**p*<0,05). Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

Para comprobar el efecto de la dieta rica en BCAA y treonina sobre el aumento del daño oxidativo en proteínas y DNA se analizaron los niveles de proteínas carboniladas y de la enzima 8-oxoguanina DNA glicosilasa (OGG1) en ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) de 5 meses de edad. La OGG1 se induce en presencia de modificaciones en el DNA producidas por aumento del estrés oxidativo ya que es la encargada de su reparación, con lo que sus niveles son indicadores de la presencia de daño oxidativo a DNA (Sampath y Lloyd, 2019).

En el corazón, se observó una disminución significativa en los niveles de OGG1 en los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) frente a los *wild-type*, mientras que el nivel de proteínas carboniladas permaneció constante (**Figura 21A**). Por el contrario, como puede observarse en la **Figura 21B**, en el hígado se observó un aumento significativo de los niveles de OGG1 en los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) frente a los *wild-type*, mientras que en el nivel de proteínas carboniladas no se detectaron cambios.



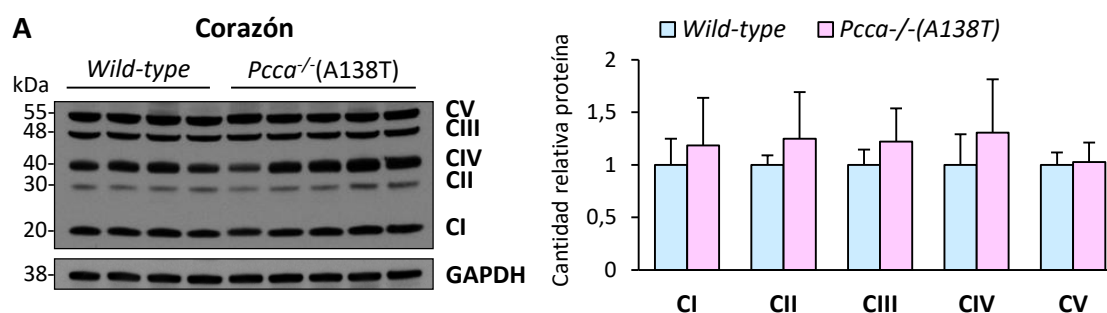


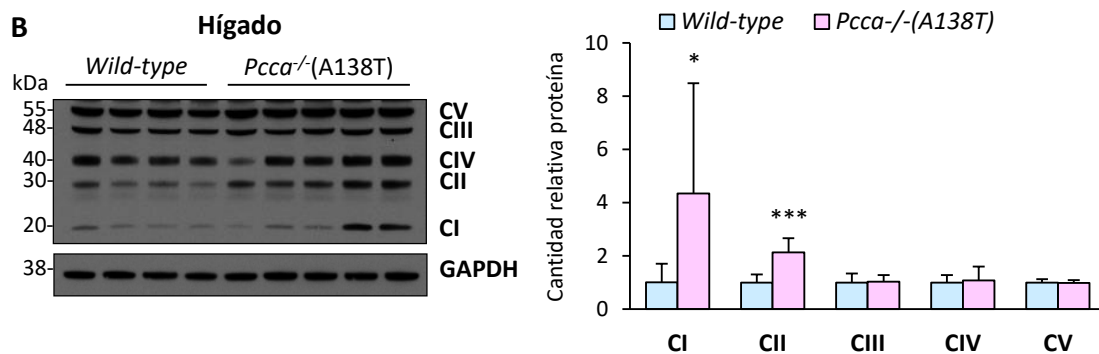
**Figura 21.** Efecto de la dieta rica en BCAA y treonina sobre el daño oxidativo a proteínas y DNA. *Western Blot* representativo para la detección de proteínas carboniladas y OGG1 en el corazón de ratones *wild-type* (n=9) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=8) de 5 meses de edad tratados con esta dieta (**panel A**) y en el hígado de ratones *wild-type* (n=8) y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) (n=10) de 5 meses de edad tratados con esta dieta (**panel B**). El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de Student (\*\*\*)*p*<0,001). Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

### 3.2| Análisis de los niveles de proteínas de los complejos de la CTE

Estudios previos han descrito una disminución en los niveles y la actividad de los complejos de la CTE en muestras de pacientes AP (Schwab *et al.*, 2006, de Keyzer *et al.*, 2009) y en el modelo murino de AP (Gallego-Villar *et al.*, 2016). Con el fin de evaluar el efecto de esta dieta rica en BCAA y treonina sobre la fosforilación oxidativa se analizó el nivel de proteínas que forman parte de los complejos de la CTE en ratones *wild-type* y *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) de 5 meses de edad.

Los resultados mostraron que en el corazón no había diferencias significativas en el nivel de ninguna de las proteínas de los complejos entre los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) y *wild-type* (**Figura 22A**). En el hígado se observó un aumento significativo de las proteínas NDUFB8 y SDHB, que forman parte de los complejos CI y CII de la CTE, respectivamente, en los ratones *PCCA*<sup>-/-</sup>(A138T) en comparación con los *wild-type* (**Figura 22B**).





**Figura 22. Efecto de la dieta rica en BCAA y treonina sobre los niveles de proteínas de los complejos de la CTE.** *Western Blot* representativo para la detección de proteínas de los complejos de la CTE CI (NDUFB8), CII (SDHB), CIII (UQCRC2), CIV (MTCO1) y CV (ATP5A) en el corazón de ratones *wild-type* (n=9) y *PCCA*<sup>-/(A138T)</sup> (n=8) de 5 meses de edad tratados con esta dieta (**panel A**) y en el hígado de ratones *wild-type* (n=8) y *PCCA*<sup>-/(A138T)</sup> (n=10) de 5 meses de edad tratados con esta dieta (**panel B**). El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH. Análisis estadístico *t* de Student (\*p<0,05, \*\*\*p<0,001). Los experimentos fueron repetidos, al menos, dos veces más con similares resultados.

## Modelos celulares de AP

### 1. Generación de nuevos modelos celulares basados en la reprogramación de fibroblastos a iPSCs

Para una mejor caracterización de las vías implicadas en el desarrollo de la AP y la búsqueda de nuevos tratamientos es necesaria la obtención de nuevos modelos de enfermedad que reproduzcan fielmente los síntomas bioquímicos y clínicos de la AP. Hasta el momento, los modelos celulares empleados han sido fibroblastos de pacientes, pero tienen ciertas limitaciones, lo cual pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos modelos celulares humanos de enfermedad. Las células somáticas adultas humanas se han reprogramado con éxito, utilizando varias tecnologías, a células iPSCs que poseen características similares a las de las células madre embrionarias y que, posteriormente, pueden ser diferenciadas a cualquier tipo celular (Doss y Sachinidis, 2019). Por ello, en este trabajo se han reprogramado fibroblastos de un paciente con mutaciones en el gen *PCCA* y otro con mutaciones en el gen *PCCB* a iPSCs para generar dos nuevos modelos celulares de esta patología.

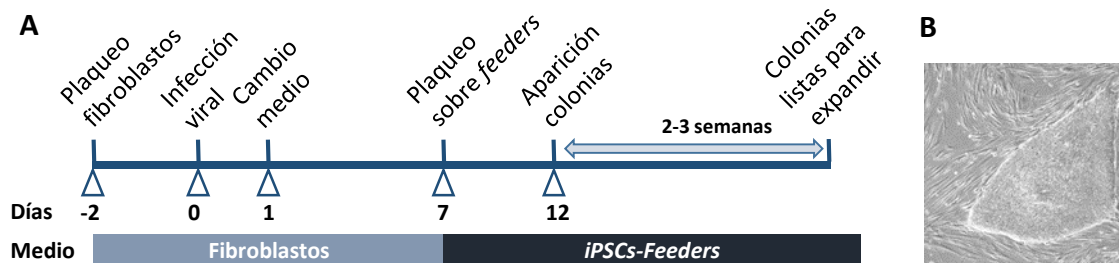
#### 1.1| Reprogramación de fibroblastos PCCA a iPSCs

Fibroblastos de un paciente AP con dos mutaciones en heterocigosis en el gen *PCCA*, previamente caracterizadas (Desviat *et al.*, 2009), y con una presentación moderada de la enfermedad (**Tabla 11**) se reprogramaron a iPSCs para generar una línea celular denominada a partir de ahora iPSCs PCCA.

**Tabla 11.** Información sobre el paciente PCCA seleccionado

Genotipo	Fenotipo bioquímico	Tratamiento	Fenotipo clínico
<u>Alelo 1:</u> c.1899+4_1899+7delAGTA p.(Cys616_Val633del)	Aumento de lisina, glicina, metilcarnitina y propionilcarnitina y disminución de carnitina.	Tratamiento dietético y suplementación con carnitina	Retraso en el desarrollo, hipotonía, infecciones recurrentes y pancreatitis crónica
<u>Alelo 2:</u> c.1430_1643del p.(Gly477Glufs*9)	Actividad PCC del 8%		

La reprogramación se llevó a cabo utilizando un método de reprogramación no integrativo basado en el uso del virus Sendai que codifica los cuatro factores OSKM (Takahashi y Yamanaka, 2006). En la **Figura 23** puede observarse un esquema del proceso llevado a cabo durante la reprogramación y una imagen de una colonia de iPSCs creciendo sobre *feeders* en la que se puede apreciar su morfología característica.



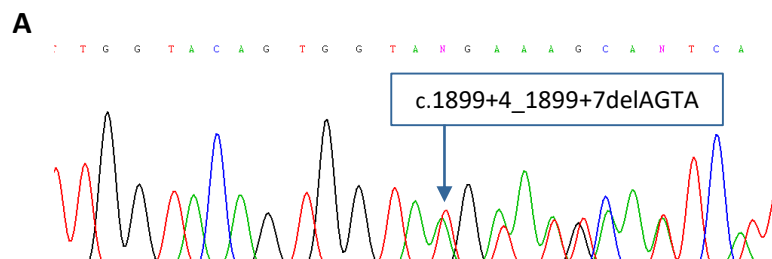
**Figura 23.** Esquema representativo del proceso de reprogramación de iPSCs con el virus Sendai. Proceso esquemático de la reprogramación de fibroblastos para la generación de iPSCs especificando el cronograma y los medios de cultivo, que hacen referencia a los de la Tabla 5 (panel A). Imagen representativa de una colonia de iPSCs creciendo sobre *feeders* (panel B).

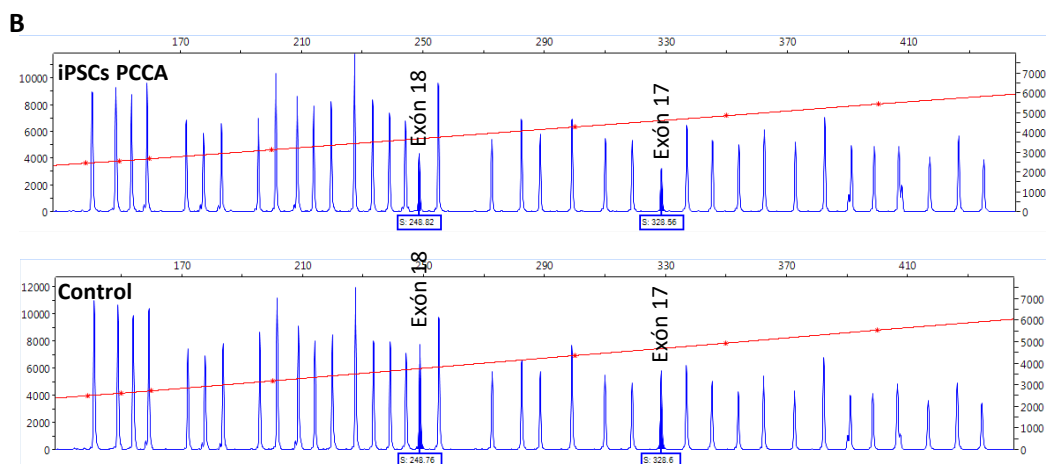
## 1.2| Caracterización iPSCs PCCA

La caracterización de las iPSCs PCCA generadas se llevó a cabo mediante diferentes pruebas y análisis para comprobar su estabilidad genética y genómica, la ausencia de los factores del virus Sendai y su pluripotencia, siguiendo protocolos ya descritos (Marti *et al.*, 2013).

### 1.2.1. Determinación de la estabilidad genética y genómica

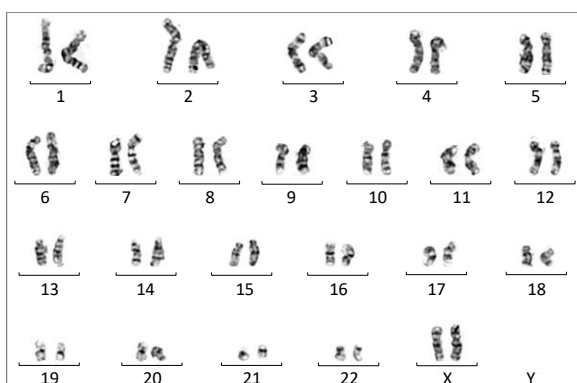
En primer lugar, se comprobó que las iPSCs mantenían las mismas mutaciones que los fibroblastos del paciente PCCA. Como puede observarse en la figura, las iPSCs PCCA presentan dos mutaciones en heterocigosis que coinciden con las descritas en los fibroblastos de este paciente (Desviat *et al.*, 2009); en el alelo 1 se detectó una deleción de 4 nucleótidos en el exón 21 (**Figura 24A**) y, en el alelo 2, una deleción completa de los exones 17 y 18 (**Figura 24B**) del gen *PCCA*.





**Figura 24. Identificación de las mutaciones del paciente en las iPSCs PCCA.** Electroferograma de la secuenciación del exón 21 del gen *PCCA* en las iPSCs para la identificación de la mutación c.1899+4\_1899+7delAGTA (**panel A**). Detección por la técnica de MLPA de la delección de los exones 17 y 18 del gen *PCCA* en las iPSCs. Control: DNA de fibroblastos de un individuo sano (**panel B**).

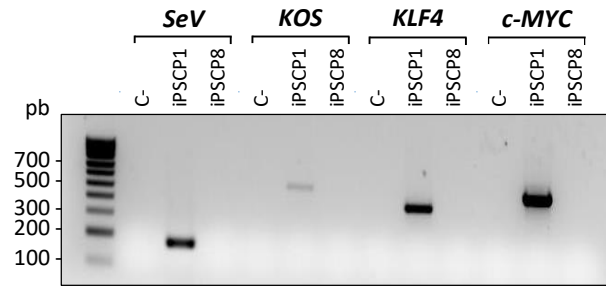
La estabilidad genómica se evaluó mediante el análisis del cariotipo de células con más de 20 pases en cultivo. Como se muestra en la **Figura 25** no se observaron alteraciones ni en el número ni en la estructura de los cromosomas, presentando un cariotipo normal (46, XX). Además, se llevó a cabo la amplificación de determinados STRs y el determinante de sexo amelogenina en los fibroblastos y en las iPSCs del paciente y se comprobó que el patrón fue idéntico en ambas líneas (datos confidenciales no mostrables).



**Figura 25. Evaluación de la estabilidad genómica en las iPSCs PCCA.** Cariotipo de las iPSCs con más de 20 pases de expansión; se trata de una imagen representativa del análisis de al menos 20 metafases.

### 1.2.2. Determinación de la eliminación del virus Sendai

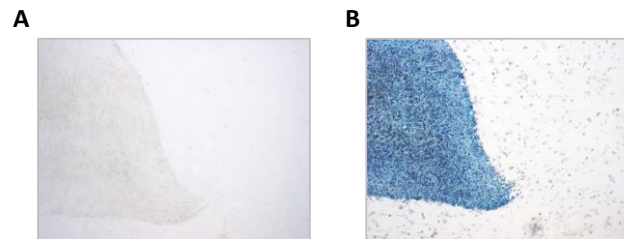
Para corroborar la ausencia del virus Sendai en las células reprogramadas se analizó si se mantenía la expresión del genoma del virus y de los factores de reprogramación en la línea de iPSCs PCCA mediante RT-PCR. Los resultados mostraron la ausencia de material exógeno de reprogramación después de 8 pases en cultivo en comparación con las células recién reprogramadas (**Figura 26**).



**Figura 26. Comprobación de la eliminación del virus Sendai en las iPSCs PCCA.** Análisis en gel de agarosa del cDNA del genoma del virus Sendai (*SeV*) y de los factores reprogramadores (*KOS*, *KLF4* y *c-MYC*) en una muestra sin DNA como control negativo (C-), las iPSCs recién reprogramadas en pase 1 (iPSCP1) y las iPSCs después de 8 pases en cultivo (iPSCP8).

### 1.2.3. Determinación de la pluripotencia

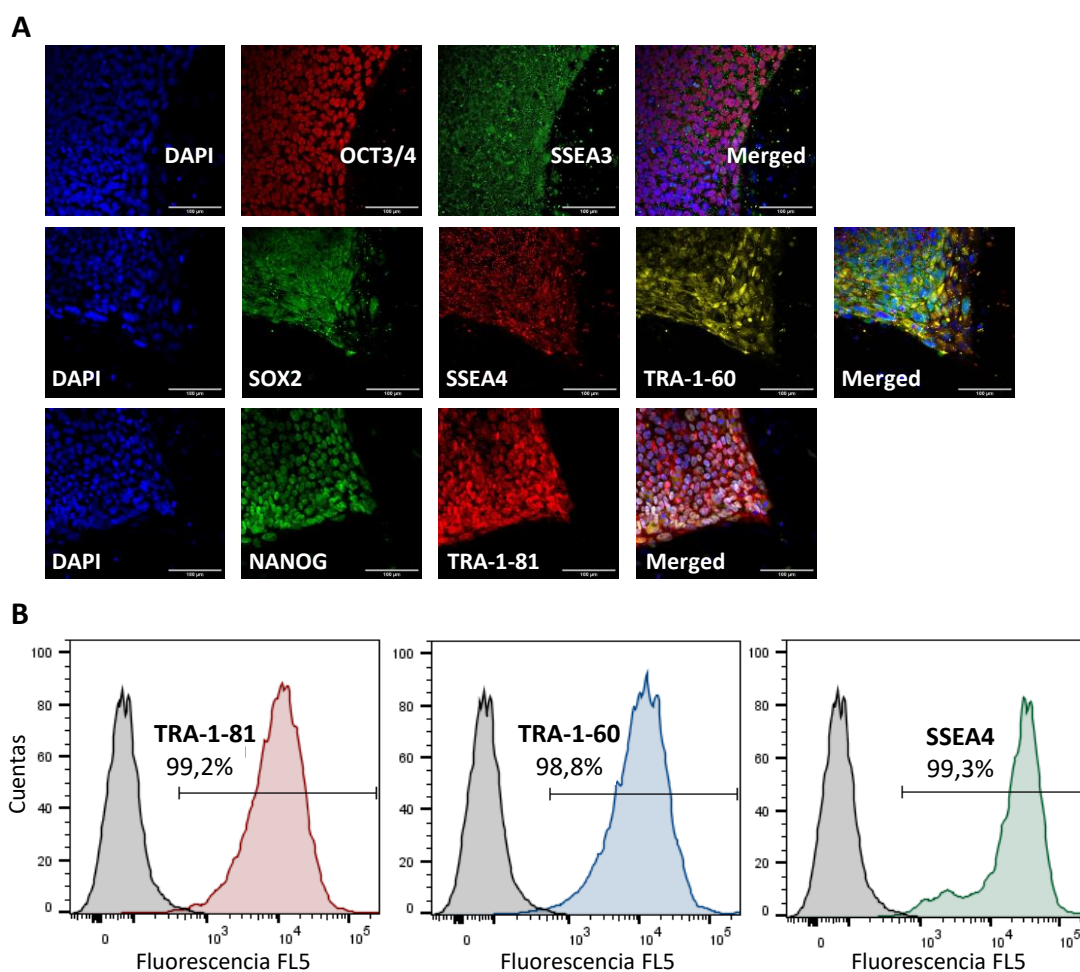
La evaluación de la pluripotencia de las iPSCs generadas se llevó a cabo utilizando diferentes métodos. En primer lugar, se confirmó la actividad fosfatasa alcalina placentaria en las iPSCs generadas utilizando un sustrato que torna las células a un color azulado en presencia de esta enzima (**Figura 27**).



**Figura 27. Evaluación de la actividad fosfatasa alcalina placentaria en las iPSCs PCCA.** Figura representativa de una colonia antes de teñir con el sustrato (**panel A**) y después de la tinción (**panel B**).

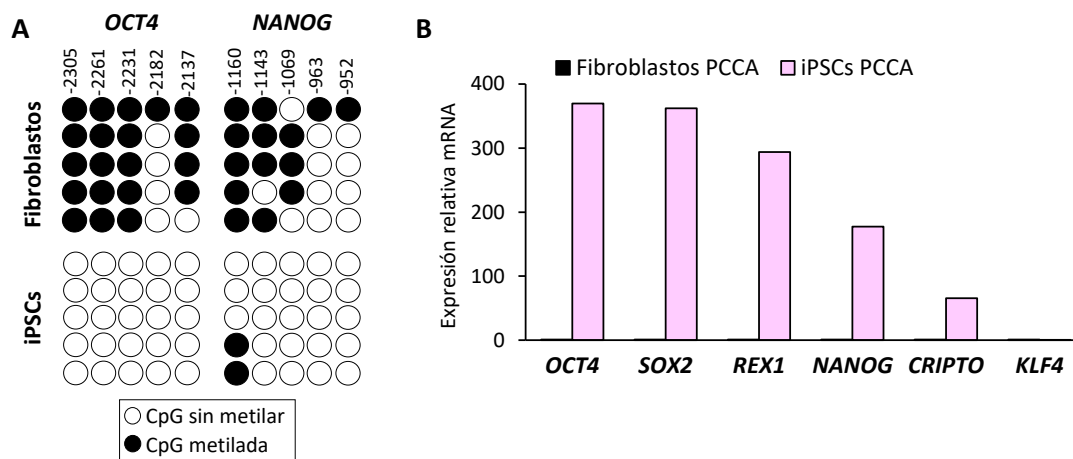
A continuación, se procedió a la evaluación de la expresión de marcadores de pluripotencia nucleares (OCT4, NANOG y SOX2) y de superficie (SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81) por inmunofluorescencia. Como puede observarse en la **Figura 28A** las iPSCs mostraron expresión de todos los marcadores analizados. Para cuantificar el nivel de expresión de algunos de estos marcadores, se analizó la expresión de los marcadores de superficie TRA-1-81, TRA-1-60 y SSEA4 mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron un alto nivel de expresión (>98%) de todos los marcadores analizados en la línea de iPSCs PCCA (**Figura 28B**).





**Figura 28.** Evaluación de la expresión de marcadores de pluripotencia en las iPSCs PCCA. Inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia nucleares (OCT4, NANOG y SOX2) y de superficie (SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81) en las iPSCs; el núcleo aparece teñido con DAPI. Barra de escala: 100 µm (**panel A**). Histograma del análisis por citometría de flujo de la expresión de los marcadores de pluripotencia de superficie TRA-1-81, TRA-1-60 y SSEA4 en las células iPSCs (**panel B**).

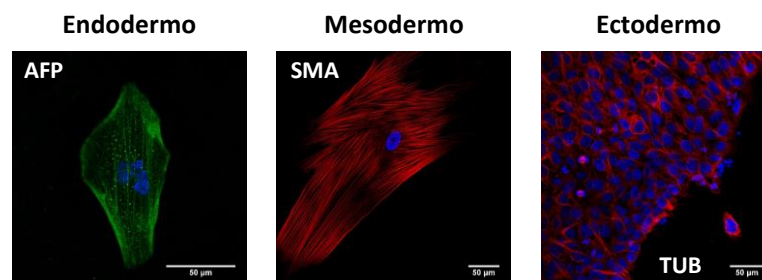
Por otro lado, se corroboró el carácter pluripotente de las iPSCs mediante el análisis de metilación de las islas CpG de los promotores de los genes *OCT4* y *NANOG* y la cuantificación de los niveles de expresión a nivel de mRNA de genes de pluripotencia por qRT-PCR. La secuenciación de los promotores de *OCT4* y *NANOG*, tras el tratamiento con bisulfito sódico, mostró la desmetilación de los dinucleótidos CpG de estos promotores en las iPSCs mientras que en los fibroblastos del paciente estaban metilados (**Figura 29A**). Además, el análisis de la expresión de distintos factores de pluripotencia mostró una elevada expresión a nivel de mRNA de todos estos factores en las iPSCs en relación a los fibroblastos (**Figura 29B**).



**Figura 29.** Evaluación de la pluripotencia a nivel genético de las iPSCs PCCA. Esquema representativo del estado de metilación de las CpG de los promotores de *OCT4* y *NANOG* en fibroblastos y iPSCs PCCA; se analizaron hasta 5 clones diferentes (**panel A**). Análisis de la expresión mediante qRT-PCR de los factores de pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *REX1*, *NANOG*, *CRIPTO* y *KLF4* en fibroblastos y iPSCs PCCA; el histograma representa el promedio de la expresión relativa de cada factor respecto a la de *GAPDH* (**panel B**).

#### 1.2.4. Determinación de la capacidad de diferenciación *in vitro*

Para comprobar la capacidad de diferenciación *in vitro* a las tres capas germinales de la línea de iPSCs PCCA generada, se comenzó con la formación de unos agregados conocidos como EBs que, posteriormente, se cultivaron utilizando diferentes medios de diferenciación específicos de cada linaje celular. Una vez obtenidas las células diferenciadas de las 3 capas germinales, se llevó a cabo la detección de la expresión de  $\alpha$ -1-fetoproteína (AFP),  $\alpha$ -actina de músculo liso (SMA) y  $\beta$ -III-tubulina Tuj1 (TUB) como marcadores de endodermo, mesodermo y ectodermo, respectivamente, por inmunofluorescencia (**Figura 30**).



**Figura 30.** Comprobación de la capacidad de diferenciación *in vitro* de las iPSCs PCCA a las tres capas germinales. Inmunofluorescencia de los marcadores de endodermo (AFP), mesodermo (SMA) y ectodermo (TUB); el núcleo aparece teñido con DAPI. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

### 1.3| Reprogramación de fibroblastos PCCB a iPSCs

Fibroblastos de un paciente AP con una mutación en homocigosis en el gen *PCCB*, previamente caracterizada (Tahara *et al.*, 1990), y con cardiomiopatía dilatada desde la infancia (**Tabla 12**) se reprogramaron a iPSCs para generar una línea celular denominada a partir de ahora iPSCs PCCB. El proceso de reprogramación fue el mismo que el llevado a cabo para las iPSCs PCCA (**Figura 23**).

**Tabla 12.** Información sobre el paciente PCCB seleccionado

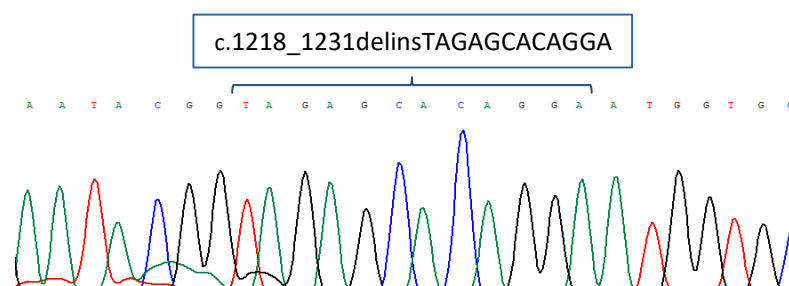
Genotipo	Fenotipo bioquímico	Tratamiento	Fenotipo clínico
<u>Alelos 1 y 2:</u> c.1218_1231delins TAGAGCACAGGA p.(Gly407Argfs*14)	Aumento de 3-hidroxi- propionato, metilcitrato, propionilglicina y tiglilglicina. Cetoacidosis. Actividad PCC no detectable en linfocitos	Tratamiento dietético y suplementación con carnitina, metronidazol, digoxina y coenzima Q <sub>10</sub>	Retraso psicomotor leve-moderado con hipotonía central, talla baja y DCM desde la infancia

### 1.4| Caracterización iPSCs PCCB

La caracterización de las iPSCs PCCB generadas se llevó a cabo mediante diferentes pruebas y análisis para comprobar su estabilidad genética y genómica, la ausencia de los factores del virus Sendai y su pluripotencia siguiendo protocolos ya descritos (Marti *et al.*, 2013).

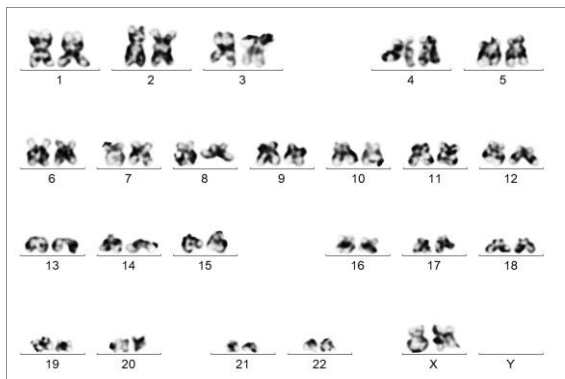
#### 1.4.1. Determinación de la estabilidad genética y genómica

En primer lugar, se comprobó que las iPSCs mantenían la misma mutación que los fibroblastos PCCB. Como puede observarse en la **Figura 31**, las iPSCs PCCB presentan en homocigosis una delección de 14 nucleótidos e inserción de 12 nucleótidos en el gen *PCCB* que se corresponde con la mutación identificada en el paciente (Tahara *et al.*, 1990).



**Figura 31.** Identificación de la mutación del paciente en las iPSCs PCCB. Electroferograma de la secuenciación de los exones 11 y 12 del gen *PCCB* en las iPSCs para la identificación de la mutación c.1218\_1231delinsTAGAGCACAGGA.

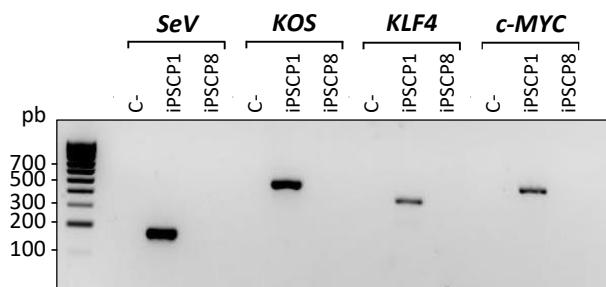
La estabilidad genómica se evaluó mediante el análisis del cariotipo de células con más de 20 pases en cultivo. Como se muestra en la **Figura 32** no se observaron alteraciones ni en el número ni en la estructura de los cromosomas, presentando un cariotipo normal (46, XX). Además, se comprobó que el patrón de STRs de las iPSCs y los fibroblastos del paciente era idéntico mediante la amplificación de determinados STRs y el determinante de sexo amelogenina en ambas líneas (datos confidenciales no mostrables).



**Figura 32.** Evaluación de la estabilidad genómica en las iPSCs PCCB. Cariotipo de las iPSCs con más de 20 pases de expansión; se trata de una imagen representativa del análisis de al menos 20 metafases.

#### 1.4.2. Determinación de la eliminación del virus Sendai

Para corroborar la ausencia del virus Sendai en las células reprogramadas, se analizó mediante RT-PCR si se mantenía la expresión del genoma del virus y los factores de reprogramación en la línea de iPSCs PCCB. Los resultados mostraron la ausencia del material exógeno de reprogramación después de 8 pases en cultivo en comparación con las células recién reprogramadas (**Figura 33**).

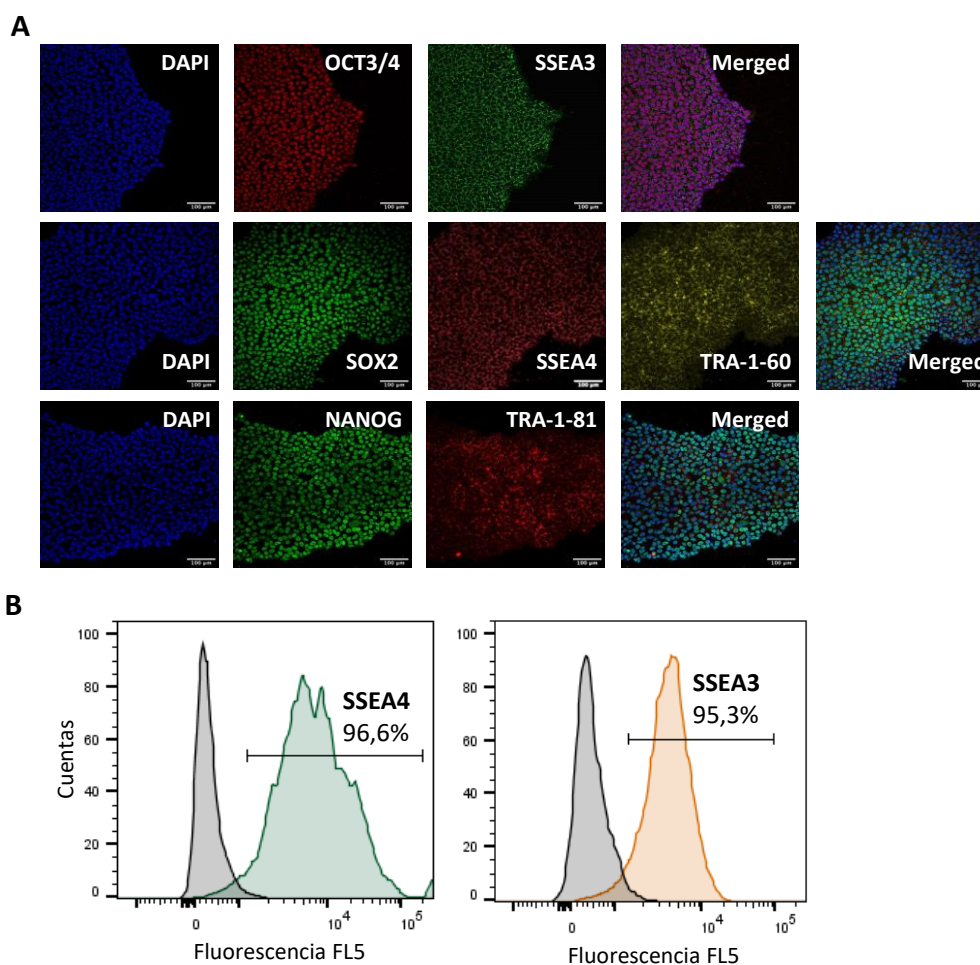


**Figura 33.** Comprobación de la eliminación del virus Sendai en las iPSCs PCCB. Análisis en gel de agarosa del cDNA del genoma del virus Sendai (*SeV*) y de los factores reprogramadores (*KOS*, *KLF4* y *c-MYC*) en una muestra sin DNA como control negativo (C-), las iPSCs recién reprogramadas en fase 1 (iPSCP1) y las iPSCs después de 8 pases en cultivo (iPSCP8).

#### 1.4.3. Determinación de la pluripotencia

La evaluación de la pluripotencia de las iPSCs generadas se llevó a cabo utilizando diferentes métodos. En primer lugar, se procedió a la evaluación de la expresión de marcadores de pluripotencia nucleares (OCT4, NANOG y SOX2) y de superficie (SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81) por inmunofluorescencia. Como puede observarse en la **Figura 34A** las iPSCs PCCB mostraron expresión de todos los marcadores analizados. Para cuantificar el nivel de expresión de algunos de

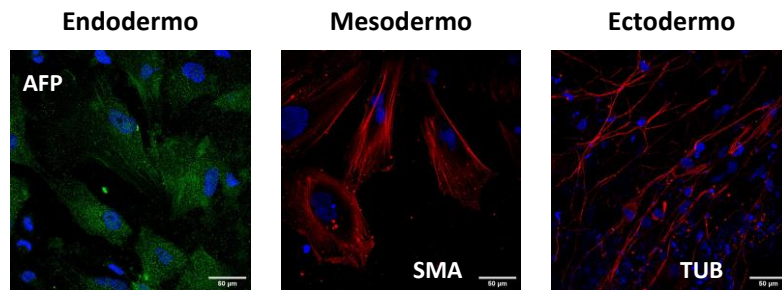
estos marcadores, se analizó la expresión de los marcadores de superficie SSEA4 y SSEA3 mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que había un alto nivel de expresión (>95%) de ambos factores en la línea de iPSCs PCCB (**Figura 34B**).



**Figura 34.** Evaluación de la expresión de marcadores de pluripotencia en las iPSCs PCCB. Inmunofluorescencia de marcadores de pluripotencia nucleares (OCT4, NANOG y SOX2) y de superficie (SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81) en las iPSCs; el núcleo aparece teñido con DAPI. Barra de escala: 100 µm (**panel A**). Histograma del análisis por citometría de flujo de la expresión de los marcadores de pluripotencia de superficie SSEA4 y SSEA3 en las células iPSCs (**panel B**).

#### 1.4.4. Determinación de la capacidad de diferenciación *in vitro*

Finalmente, se comprobó la capacidad de diferenciación *in vitro* a las tres capas germinales mediante la diferenciación de las iPSCs PCCB a endodermo, mesodermo y ectodermo y la detección por inmunofluorescencia de los marcadores específicos AFP, SMA y TUB, respectivamente (**Figura 35**).



**Figura 35.** Evaluación de la capacidad de diferenciación *in vitro* de las iPSCs PCCB a las tres capas germinales. Inmunofluorescencia de los marcadores de endodermo (AFP), mesodermo (SMA) y ectodermo (TUB); el núcleo aparece teñido con DAPI. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

## 2. Generación de nuevos modelos celulares basados en la diferenciación de iPSCs a iAs y iNs

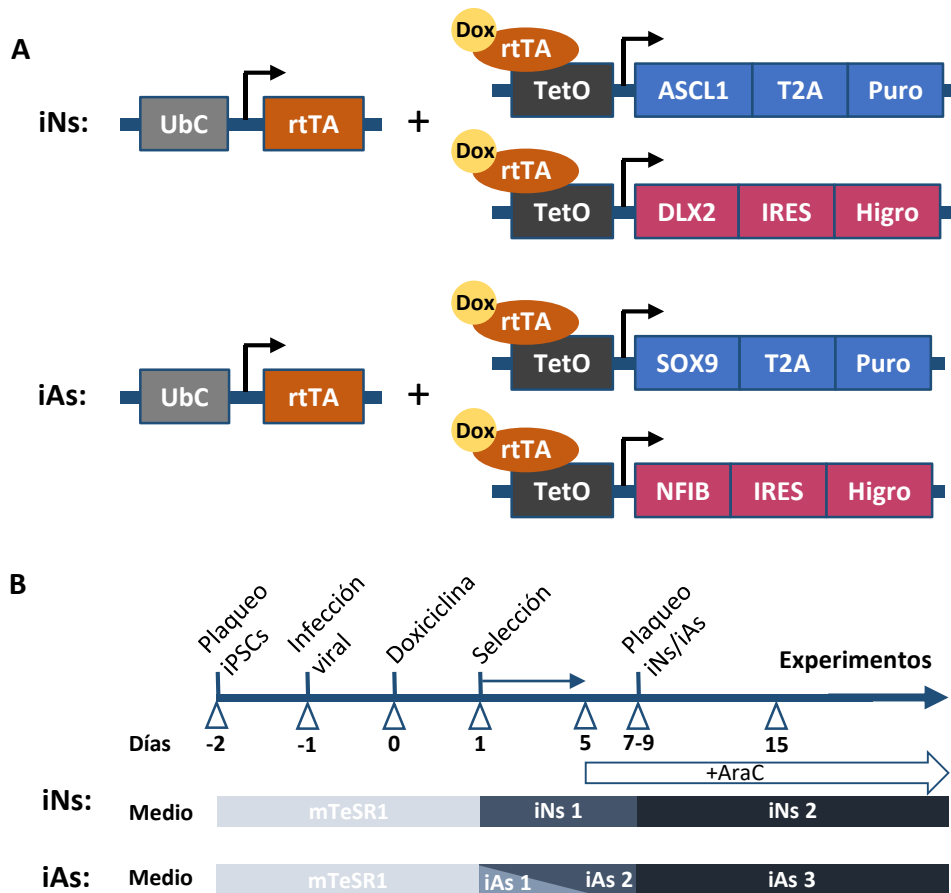
A largo plazo, unas de las alteraciones que más frecuentemente desarrollan los pacientes AP son las que se producen a nivel neurológico, especialmente en materia blanca y ganglios basales, y que generan una serie de síntomas clínicos como retraso psicomotor y cognitivo, desórdenes del movimiento y problemas psiquiátricos (Tuncel *et al.*, 2018). Aunque se postula que la acumulación de metabolitos tóxicos juega un papel relevante en el desarrollo de estas patologías, en la actualidad aún no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares que las producen (Haijes *et al.*, 2019a). Por ello, el desarrollo de nuevos modelos que nos permitan estudiar en mayor profundidad estos mecanismos es fundamental para, en un futuro, poder implementar nuevas terapias que permitan evitar o paliar estas alteraciones neurológicas.

### 2.1| Diferenciación de iPSCs Control y PCCA a iAs y iNs

Como ya se ha comentado anteriormente, los ganglios basales son una de las estructuras neurológicas más afectadas en la AP que se encargan del control motor y se encuentran formados, principalmente, por neuronas de tipo GABAérgico (Calabresi *et al.*, 2014). Por este motivo, se llevó a cabo la diferenciación de iPSCs Control y PCCA a iNs GABAérgicas utilizando un protocolo ya descrito (Yang, N. *et al.*, 2017) basado en la expresión de los factores de transcripción ASCL1 y DLX2 mediante el uso de partículas lentivirales.

Además, para la obtención de un modelo que refleje de forma más fisiológica las alteraciones neurológicas de la AP se llevó a cabo la diferenciación de iPSCs Control y PCCA a iAs utilizando un protocolo ya descrito (Canals *et al.*, 2018) mediante la expresión de los factores de transcripción SOX9 y NFIB.

Como puede observarse en la **Figura 36A**, el método utilizado en ambos casos consiste en un sistema de expresión del tipo “*Tet On*” cuya expresión es inducible por la presencia de doxiciclina en el medio de cultivo; la selección de las células infectadas puede hacerse por resistencia a los antibióticos puromicina e higromicina. La **Figura 36B** muestra un esquema del proceso de diferenciación y de los medios utilizados.



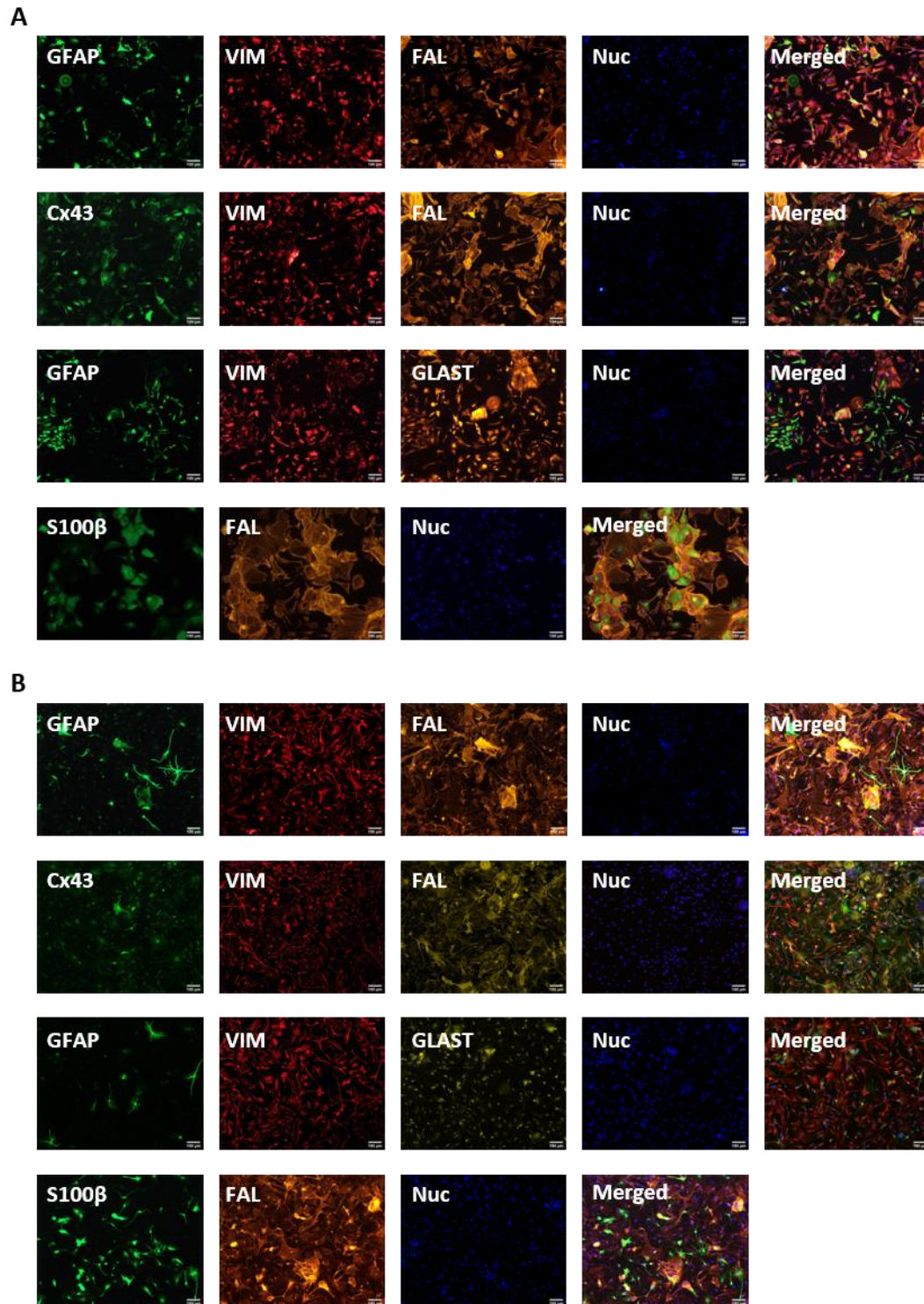
**Figura 36. Diseño experimental de la diferenciación de iPSCs a iNs y iAs.** Figura esquemática de los vectores lentivirales utilizados para la expresión de los factores ASCL1 y DLX2 (iNs) y SOX9 y NFIB (iAs) (**panel A**). Esquema representativo del proceso de diferenciación de iPSCs a iNs y iAs especificando el cronograma y los medios de cultivo, que hacen referencia a los de la Tabla 5 (**panel B**). AraC: arabinósido de citosina; Dox: doxiciclina; Higo: higromicina; IRES: sitio interno de entrada al ribosoma; Puro: puromicina; rtTA: transactivador reverso controlado por tetraciclina; T2A: péptido de autoprosesamiento 2A; TetO: promotor inducible por doxiciclina; UbC: promotor de la ubiquitina C.

## 2.2 | Caracterización de los iAs y iNs generados

Una vez puesto a punto el proceso de diferenciación de las iPSCs Control y PCCA, se llevó a cabo la caracterización de los iAs y iNs generados mediante la detección por inmunofluorescencia de marcadores específicos de cada tipo celular.

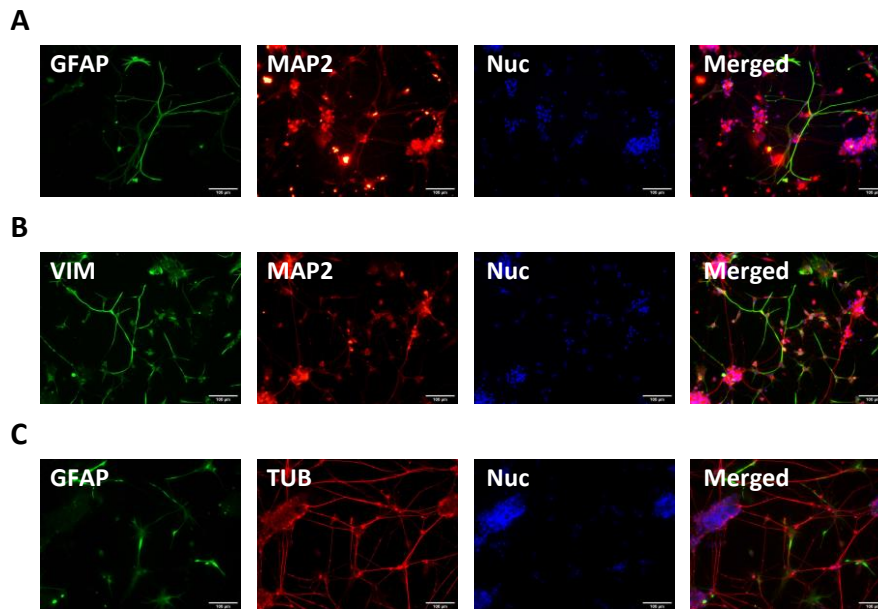
En el caso de los iAs, se analizó la presencia de marcadores típicos de astrocitos, como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), vimentina (VIM), faloidina (FAL), conexina 43 (Cx43), transportador de glutamato/aspartato (GLAST) y proteína de unión a calcio (S100 $\beta$ ), en cultivos únicos de iAs de dos semanas de diferenciación. El análisis reveló la presencia de todos los marcadores tanto en los iAs Control (**Figura 37A**) como en los iAs PCCA (**Figura 37B**).





**Figura 37.** Evaluación de la expresión de marcadores de iAs por inmunofluorescencia. Inmunofluorescencia de marcadores típicos de astrocitos: GFAP, VIM, FAL, Cx43, GLAST y S100 $\beta$ , en iAs Control (**panel A**) y en iAs PCCA (**panel B**); el núcleo (Nuc) aparece teñido con Hoechst. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

En el caso de las iNs, el análisis se realizó sobre cocultivos de iAs y iNs de cuatro semanas de diferenciación. Como puede observarse en la **Figura 38**, los iAs expresan los marcadores astrocíticos GFAP y VIM y las iNs, los marcadores neuronales TUB y la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2).



**Figura 38.** Evaluación de la expresión de marcadores de iAs y iNs por inmunofluorescencia. Inmunofluorescencia de los marcadores astrocíticos GFAP y VIM y los neuronales MAP2 y TUB, en cocultivos de iAs PCCA y iNs PCCA (**paneles A y B**) y iAs Control y iNs Control (**panel C**) de 4 semanas de diferenciación; el núcleo (Nuc) aparece teñido con Hoechst. Barra de escala: 100 µm.

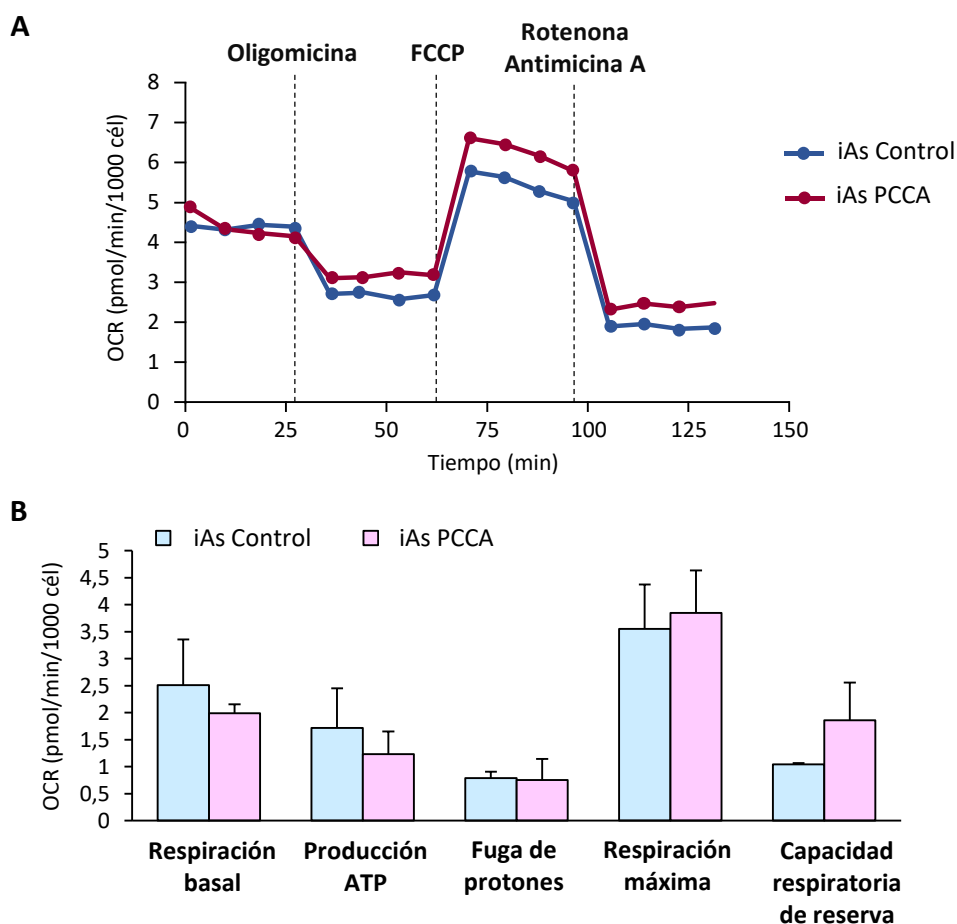
## 2.3| Caracterización de la fisiopatología de los iAs y iNs generados

Una vez generados los nuevos modelos celulares de AP se planteó iniciar la caracterización del fenotipo fisiopatológico mediante el análisis de varios parámetros.

### 2.3.1. Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno

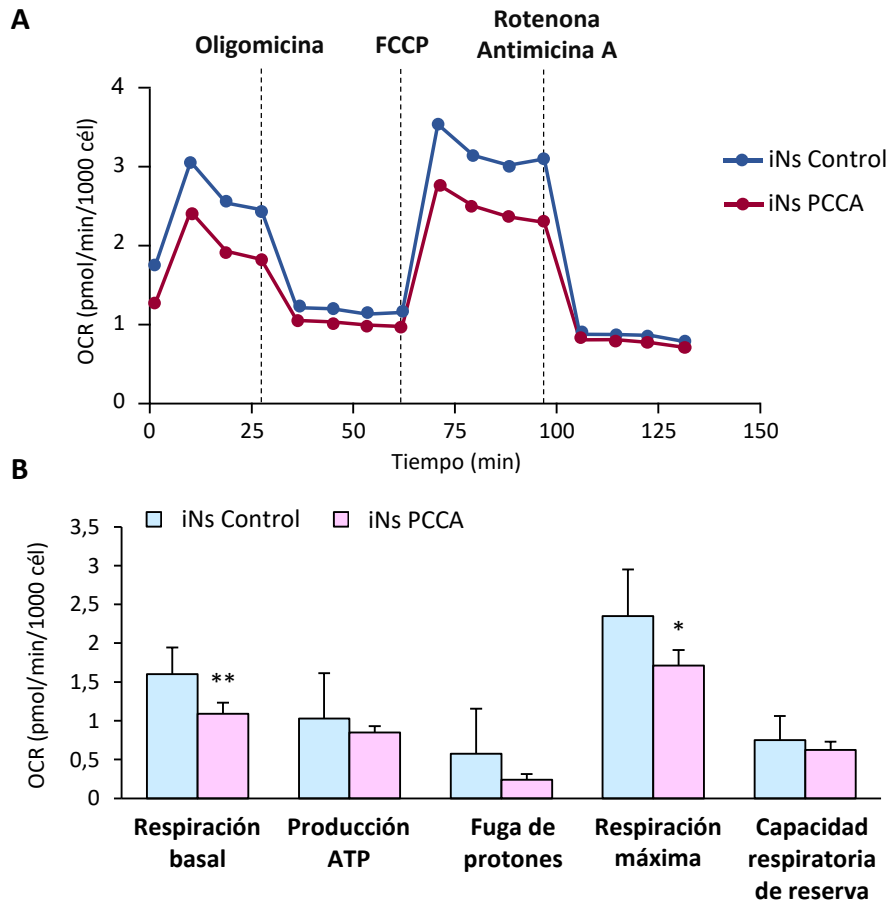
El cerebro es un órgano con una gran demanda energética y es por ello que la función mitocondrial es altamente requerida en este tejido (Annesley y Fisher, 2019). Como se ha mencionado anteriormente, la acumulación de metabolitos tóxicos en la AP produce una inhibición de la respiración mitocondrial y el metabolismo energético celular que podría contribuir al desarrollo de las patologías neurológicas (Haijes *et al.*, 2019a). Por ello, en este trabajo se ha querido comprobar si los nuevos modelos celulares generados también presentan una alteración de la respiración mitocondrial.

Para evaluar el perfil bioenergético de los iAs y las iNs se monitorizó, utilizando el sistema *Seahorse*, la OCR a tiempo real en estado basal y tras la adición de distintos compuestos que interfieren con la respiración, permitiendo el cálculo de parámetros relevantes como la respiración basal, la producción de ATP, la fuga de protones, la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva (Smolina *et al.*, 2017). El análisis del perfil bioenergético de los iAs Control y PCCA mostró que no hay diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados (**Figura 39**).



**Figura 39.** Evaluación del perfil de consumo de oxígeno de los iAs. Perfil representativo de la OCR de iAs Control e iAs PCCA en estado basal y tras la adición de las drogas oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A (**panel A**). Histograma que recoge los valores de los distintos parámetros relacionados con la OCR; se representa el promedio y la desviación estándar de, al menos, 3 experimentos por triplicado (**panel B**). Análisis estadístico *t* de Student.

Por otro lado, las iNs PCCA mostraron un perfil respiratorio deprimido respecto a las iNs Control, debido a una disminución significativa en los parámetros de respiración basal y respiración máxima (Figura 40).

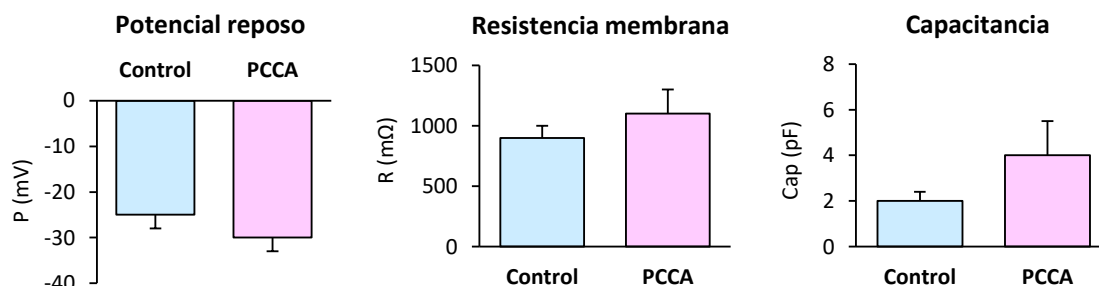


**Figura 40.** Evaluación del perfil de consumo de oxígeno de las iNs. Perfil representativo de la OCR de iNs Control y iNs PCCA en estado basal y tras la adición de las drogas oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A (panel A). Histograma que recoge los valores de los distintos parámetros relacionados con la OCR; se representa el promedio y la desviación estándar de, al menos, 3 experimentos por triplicado. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ) (panel B).

### 2.3.2. Evaluación de las PSCs GABAérgicas

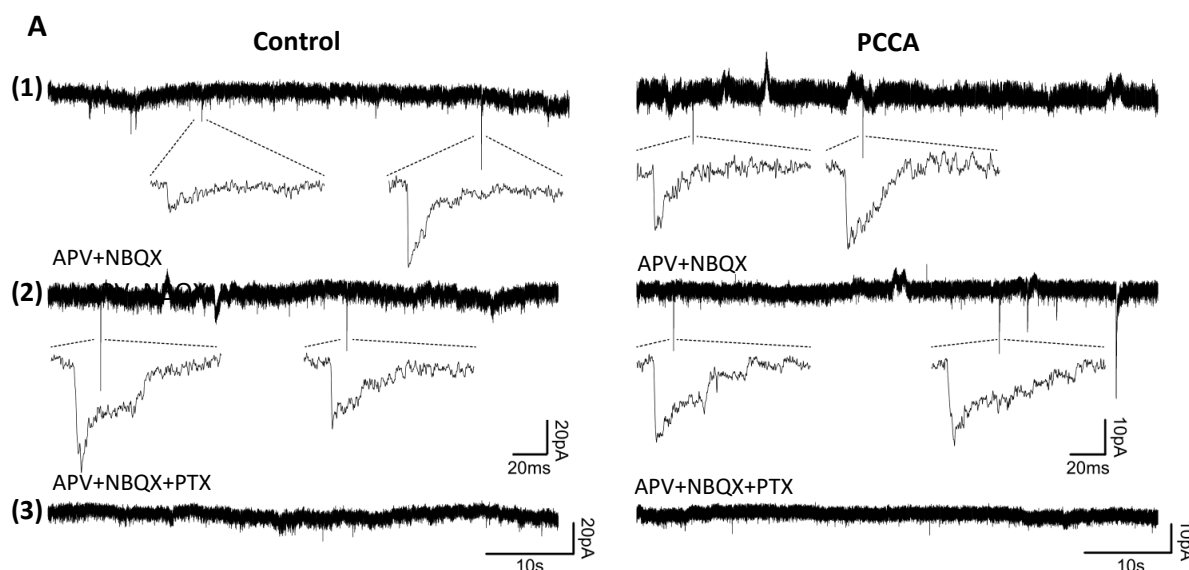
Estudios previos han demostrado que el propionato produce un aumento de la concentración de GABA en el cerebro debido a la inhibición de la enzima encargada de su degradación, lo cual podría explicar la letargia observada en un modelo murino inducido de AP (Morland *et al.*, 2018). Para comprobar si en nuestro modelo también se produce una alteración de la transmisión sináptica mediada por GABA, se analizaron las PSCs GABAérgicas en las iNs generadas.

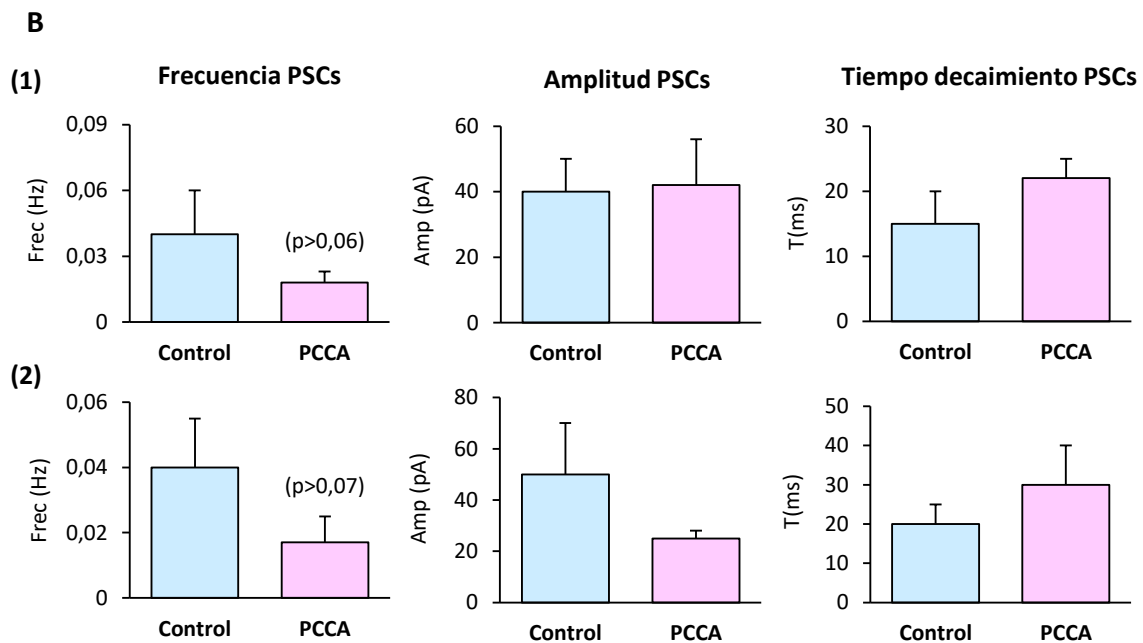
Para ello, se analizaron, mediante la técnica de *whole cell patch clamp*, cocultivos de cuatro semanas de diferenciación de iAs Control-iNs Control (Control) y iAs PCCA-iNs PCCA (PCCA). Se comprobó que las propiedades eléctricas pasivas, como el potencial de reposo, resistencia de la membrana y capacitancia, no difieren significativamente en ambos cocultivos (**Figura 41**).



**Figura 41.** Evaluación de las propiedades eléctricas pasivas de las iNs. Histograma que representa la media y la desviación estándar de los parámetros electrofisiológicos de potencial de reposo, resistencia de membrana y capacitancia de los cocultivos iAs Control-iNs Control (Control; n=7) y iAs PCCA-iNs PCCA (PCCA; n=8). Análisis estadístico *t* de Student.

Posteriormente, se evaluó la presencia de PSCs en condiciones (1) normales; (2) aislando sólo las corrientes GABAérgicas mediante los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA, APV y NBQX, respectivamente; y (3) inhibiendo, además, las corrientes GABAérgicas mediante el antagonista de los receptores GABA, PTX. Se encontraron PSCs en 5 de 7 iNs en los cocultivos Control (71%) y en 3 de 8 en los PCCA (38%). En estas iNs se analizaron los parámetros de frecuencia, amplitud y tiempo de decaimiento en las dos primeras condiciones. Como puede observarse en la **Figura 42**, los resultados no mostraron diferencias en los parámetros de amplitud y tiempo de decaimiento entre los cocultivos del control y del paciente. Sin embargo, la frecuencia de las PSCs GABAérgicas de los cocultivos PCCA aparece disminuida, aunque de forma no significativa ( $p > 0,05$ ), en ambas condiciones.





**Figura 42. Evaluación de las PSCs GABAérgicas de las iNs.** Diagrama que muestra la presencia de PSCs GABAérgicas en cocultivos iAs Control-iNs Control (Control) y iAs PCCA-iNs PCCA (PCCA) de 4 semanas de diferenciación en condiciones (1) normales; (2) aislándolas por la presencia de APV 50  $\mu$ M y NBQX 5  $\mu$ M; y (3) inhibiéndolas por PTX 100  $\mu$ M (**panel A**). Histograma que representa la media y la desviación estándar de los parámetros electrofisiológicos frecuencia, amplitud y tiempo de decaimiento de las PSCs GABAérgicas en cocultivos Control (n=5) y PCCA (n=3), en las condiciones (1) y (2) (**panel B**). Análisis estadístico *t* de Student.

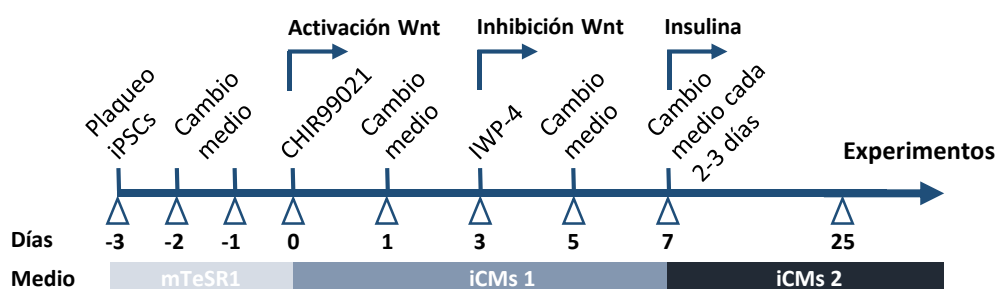
### 3. Generación de nuevos modelos celulares basados en la diferenciación de iPSCs a iCMs

Las cardiomiopatías, especialmente la HCM, la DCM y las arritmias ventriculares, son unas de las patologías que con más frecuencia desarrollan los pacientes AP a largo plazo. Aunque aún no se conocen los mecanismos moleculares que las causan, se postula que la disfunción mitocondrial y el desbalance del metabolismo bioenergético tienen un papel fundamental en su desarrollo (Kovacevic *et al.*, 2020). Para la búsqueda de nuevos tratamientos efectivos que eviten o mejoren las alteraciones cardíacas en los pacientes AP es necesario profundizar en sus mecanismos fisiopatológicos utilizando nuevos modelos humanos de la enfermedad.

#### 3.1| Diferenciación de iPSCs Control, PCCA y PCCB a iCMs

Aunque el modelo murino hipomorfo de AP ha resultado ser un buen modelo para el estudio de esta enfermedad, las limitaciones asociadas al uso de un modelo murino para el estudio de las patologías cardíacas (Breckenridge, 2010) ponen de manifiesto la necesidad de generar mejores modelos cardíacos. Por ello, en este trabajo se planteó la diferenciación de las líneas iPSCs de los dos pacientes PCCA y PCCB, que presentan distinto fenotipo cardíaco, a iCMs para obtener nuevos modelos celulares humanos de esta enfermedad.

La diferenciación de las iPSCs Control, PCCA y PCCB se ha llevado a cabo utilizando un protocolo previamente descrito (Lian *et al.*, 2013), basado en la modulación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina mediante los compuestos CHIR99021 y IWP-4. En la **Figura 43** puede observarse un esquema del proceso de diferenciación y los medios utilizados.

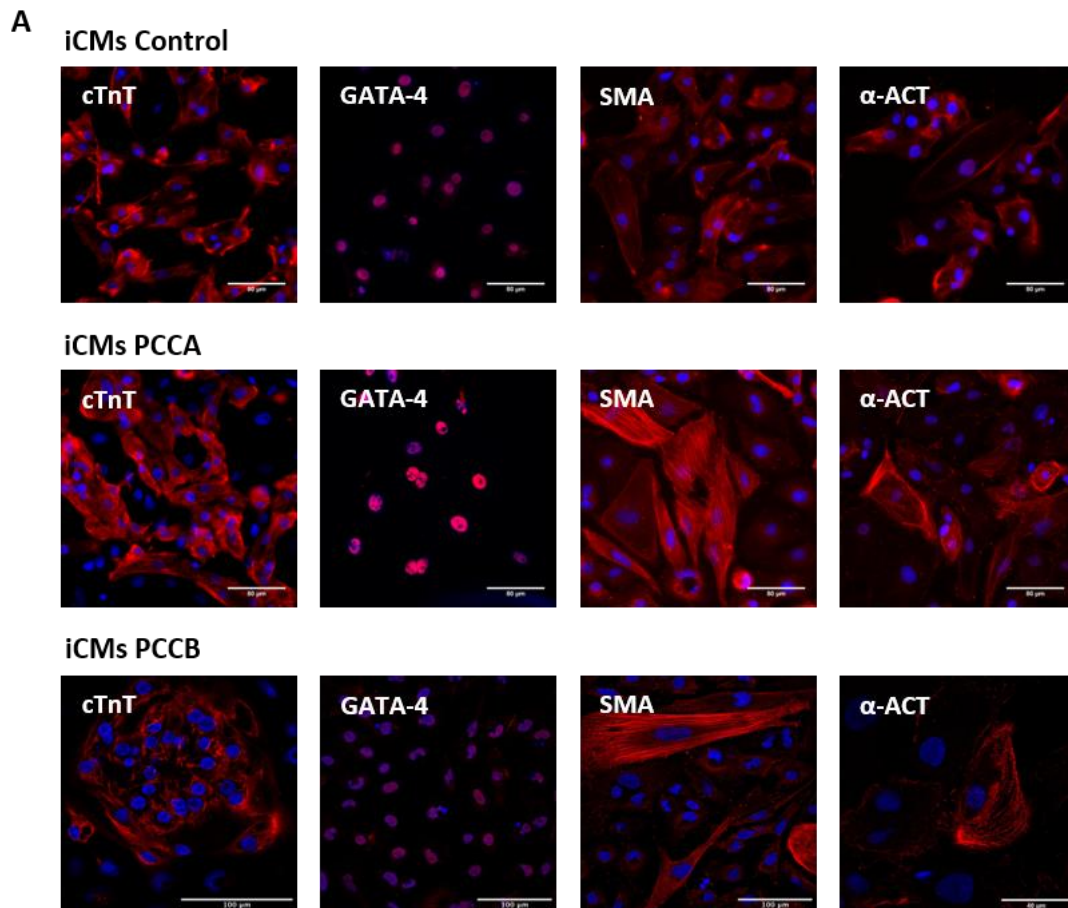


**Figura 43.** Esquema representativo del proceso de diferenciación de iPSCs a iCMs. Protocolo esquemático que muestra el proceso de diferenciación de iPSCs a iCMs especificando el cronograma y los medios de cultivo, que hacen referencia a los de la Tabla 5.

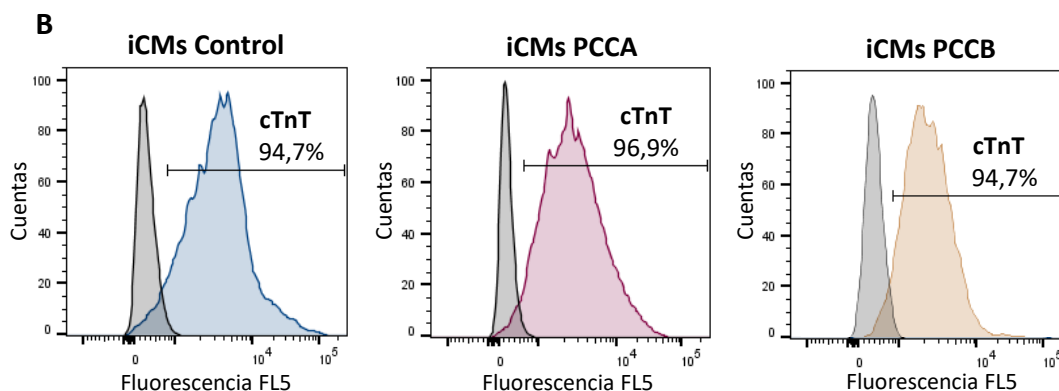
### 3.2 | Caracterización de los iCMs generados

Una vez puesto a punto el protocolo de diferenciación para los iCMs Control, PCCA y PCCB se llevó a cabo su caracterización. Primeramente, se comprobó la aparición del latido espontáneo en los cultivos de iCMs a partir del día 10 de la diferenciación, que se volvió más robusto a partir del día 5 y continuó así hasta el final de los experimentos.

A partir del día 25 de la diferenciación se analizó la expresión de marcadores cardíacos mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo. Como puede observarse en la **Figura 44A**, se detectó la expresión de los marcadores troponina T cardíaca (cTnT), GATA-4, SMA y  $\alpha$ -actinina ( $\alpha$ -ACT) en los iCMs Control, PCCA y PCCB por microscopía. Además, se cuantificaron los niveles de cTnT por citometría de flujo, revelando un número de células positivas mayor al 94% en los tres casos, lo que refleja la obtención de cultivos puros de iCMs (**Figura 44B**).







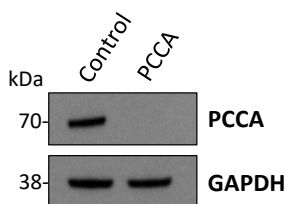
**Figura 44.** Evaluación de la expresión de marcadores cardíacos en los iCMs. Inmunofluorescencia de los marcadores cardíacos cTnT, GATA-4, SMA y  $\alpha$ -ACT en los iCMs Control, PCCA y PCCB; el núcleo aparece teñido con DAPI. Barra de escala: 80  $\mu$ m iCMs Control y PCCA; 100  $\mu$ m iCMs PCCB, excepto  $\alpha$ -ACT 40  $\mu$ m (**panel A**). Histograma del análisis por citometría de flujo de la expresión del marcador cardíaco cTnT en los iCMs Control, PCCA y PCCB (**panel B**).

Con el objetivo de comprobar que los iCMs de los pacientes PCCA y PCCB reflejan el fenotipo bioquímico de la enfermedad se analizó por espectrometría de masas el nivel del metabolito diagnóstico propionilcarnitina. En concordancia con lo observado en los pacientes AP (Fraser y Venditti, 2016), los resultados mostraron un aumento de unas 50 veces de los niveles de propionilcarnitina en los iCMs PCCA y PCCB respecto a los iCMs Control (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Niveles de propionilcarnitina en iCMs Control, PCCA y PCCB

Muestra de partida	Propionilcarnitina ( $\mu$ M)
iCMs Control	0,05
iCMs PCCA	3,43
iCMs PCCB	2,31

Además, se quiso comprobar la deficiencia de la proteína PCCA en los iCMs PCCA respecto a los iCMs Control. Para ello, se analizaron sus niveles mediante la técnica de *Western Blot*, lo que reveló una ausencia completa de la proteína en los iCMs PCCA (**Figura 45**). En el caso de los iCMs PCCB no se pudo comprobar la ausencia de proteína PCCB al no haber anticuerpos disponibles.



**Figura 45.** Evaluación del nivel de la proteína PCCA en los iCMs PCCA. *Western Blot* para la detección de la proteína PCCA en iCMs Control y PCCA; se utilizó GAPDH como control de carga.

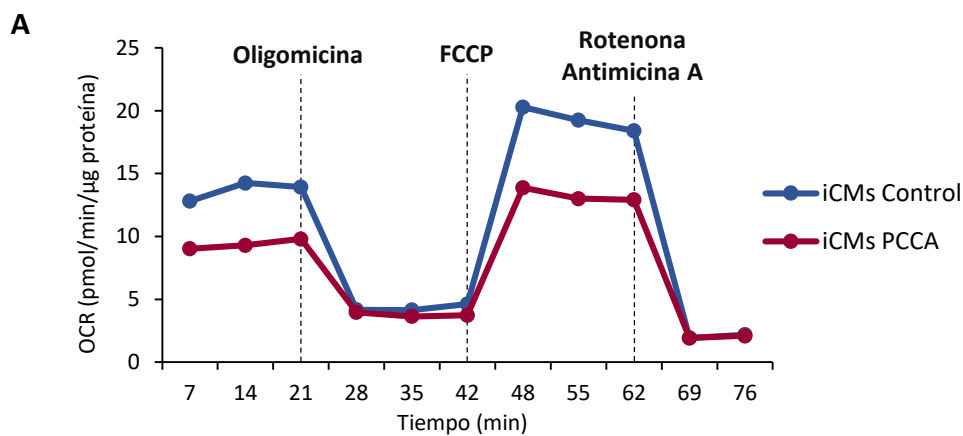
### 3.3| Caracterización de la fisiopatología de los iCMs PCCA

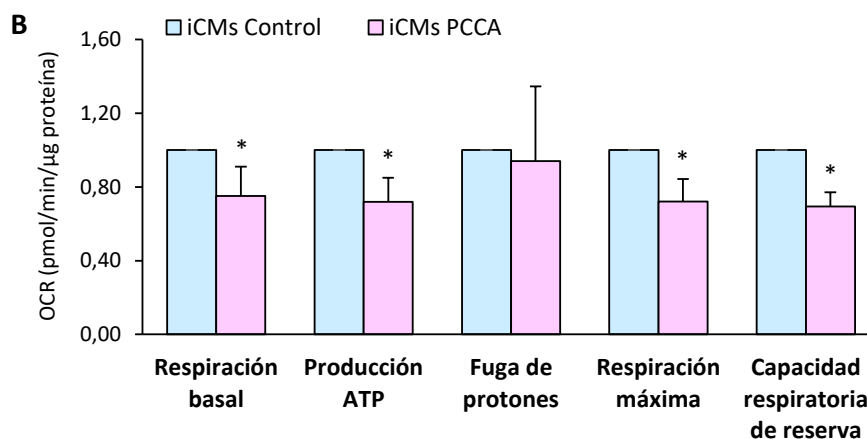
Una vez generado y caracterizado este nuevo modelo de enfermedad y con el objetivo de obtener una mayor comprensión de la patología cardíaca en la AP, se propuso el análisis de distintas vías y procesos fundamentales para el correcto funcionamiento cardíaco, centrándonos especialmente en aquellos en los que previamente se habían descrito alteraciones en el modelo murino hipomorfo de AP.

#### 3.3.1. Evaluación de la función mitocondrial

El corazón es el tejido metabólicamente más activo del organismo, lo cual se refleja en el contenido de un gran número de mitocondrias que son las que producen la energía necesaria para mantener el latido cardíaco. Numerosas patologías cardíacas se asocian a alteraciones en la estructura mitocondrial, aumento del estrés oxidativo, disminución de la biogénesis mitocondrial, problemas en la fisión y/o fusión mitocondrial, etc. (Sabbah, 2020). Por ello, en este trabajo se decidió evaluar la función mitocondrial de los iCMs generados atendiendo a varios parámetros, como la OCR, los niveles de proteínas de la CTE y la biogénesis y la estructura mitocondrial.

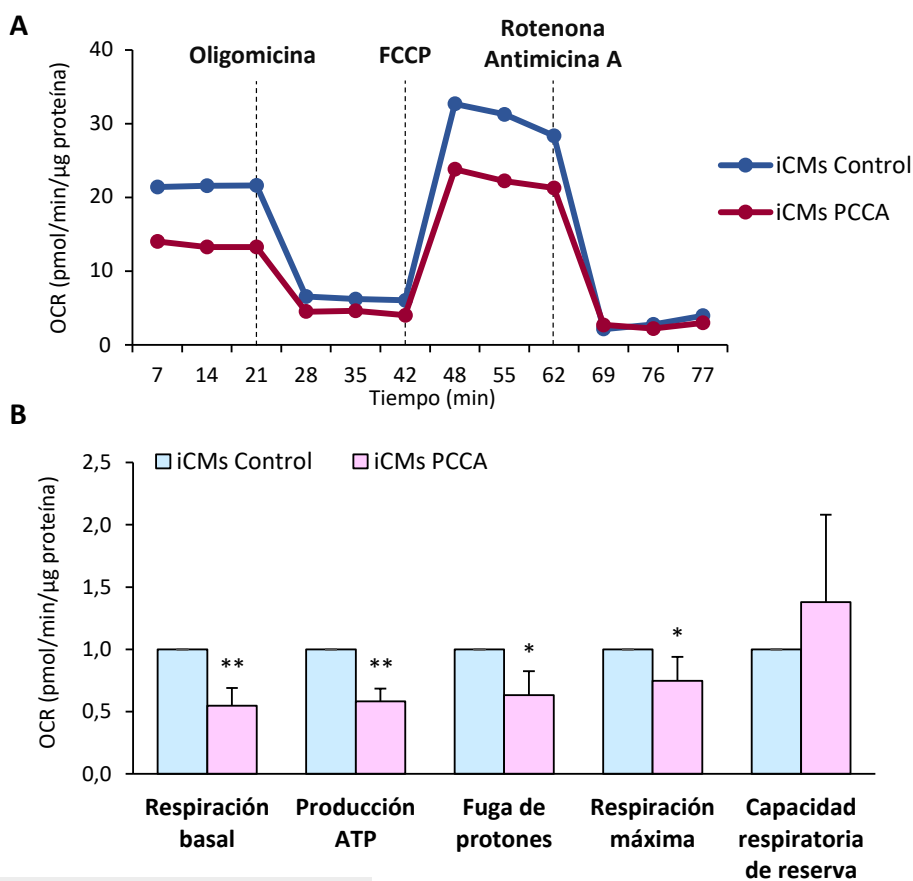
En primer lugar, se evaluó el perfil bioenergético de los iCMs utilizando el sistema *Seahorse* para monitorizar la OCR a tiempo real, en estado basal y tras la adición de distintos compuestos que interfieren con la respiración. El primer análisis se realizó en un medio estándar con glucosa a una concentración de 5,5 mM. Los resultados mostraron una disminución en la tasa de respiración de los iCMs PCCA respecto a los Control (**Figura 46A**), lo cual viene reflejado por una disminución significativa en los parámetros de respiración basal, producción de ATP, respiración máxima y capacidad respiratoria de reserva (**Figura 46B**).





**Figura 46.** Evaluación del perfil de consumo de oxígeno de los iCMs en un medio con glucosa. Perfil representativo de la OCR de iCMs Control y PCCA en estado basal y tras la adición de las drogas oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A (**panel A**). Histograma que recoge los valores de los distintos parámetros relacionados con la OCR; se representa el promedio y la desviación estándar de, al menos, 3 experimentos por triplicado. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ ) (**panel B**).

Posteriormente, se realizó el mismo análisis, pero en un medio con galactosa a 5,5 mM para promover la producción de ATP por medio de la fosforilación oxidativa (Aguer *et al.*, 2011). Los resultados fueron similares a los obtenidos anteriormente, con una disminución significativa de la respiración en los iCMs PCCA frente a los Control en los parámetros de respiración basal, producción de ATP, fuga de protones y respiración máxima (**Figura 47**).

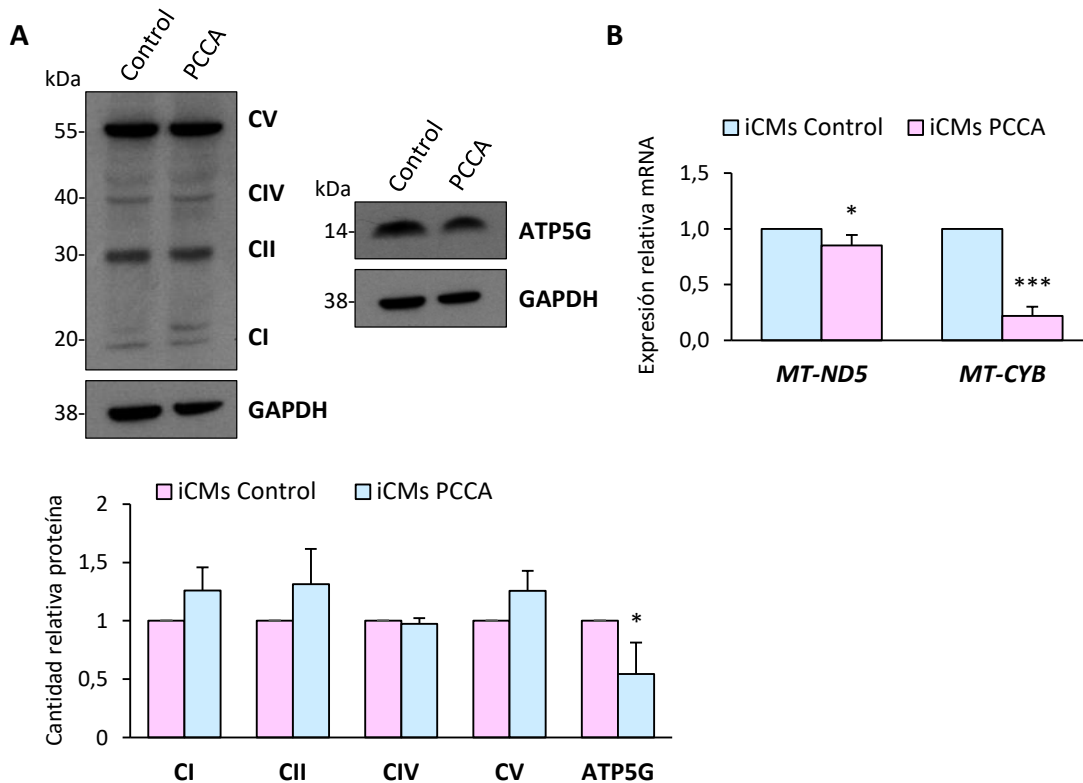


**Figura 47.** (Pie figura página siguiente)

(Página anterior)

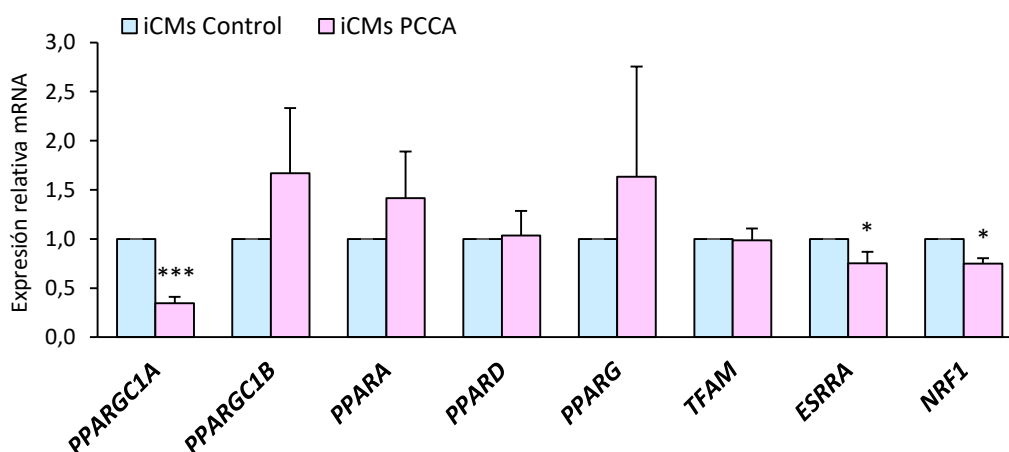
**Figura 47.** Evaluación del perfil de consumo de oxígeno de los iCMs en un medio con galactosa. Perfil representativo de la OCR de iCMs Control y PCCA en estado basal y tras la adición de las drogas oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A (**panel A**). Histograma que recoge los valores de los distintos parámetros relacionados con la OCR; se representa el promedio y la desviación estándar de, al menos, 3 experimentos por triplicado. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ) (**panel B**).

Para comprobar si el defecto en la respiración mitocondrial es debido a una alteración de los complejos de la CTE se analizaron los niveles de proteínas presentes en cada uno de ellos, así como de la subunidad c de la ATP sintasa (ATP5G) en los iCMs generados. Como puede observarse en la **Figura 48A**, no se encontraron diferencias en los niveles de proteínas de los complejos de la CTE entre los iCMs Control y PCCA, mientras que los iCMs del paciente mostraron una disminución significativa en los niveles de ATP5G. Por otro lado, se decidió analizar la expresión a nivel de mRNA de los genes mitocondriales *MT-ND5* y *MT-CYB* que codifican la NADH deshidrogenasa 5 del complejo I y el citocromo B del complejo III, respectivamente. Los resultados mostraron una disminución significativa en la expresión de ambos genes en los iCMs PCCA respecto a los Control (**Figura 48B**).



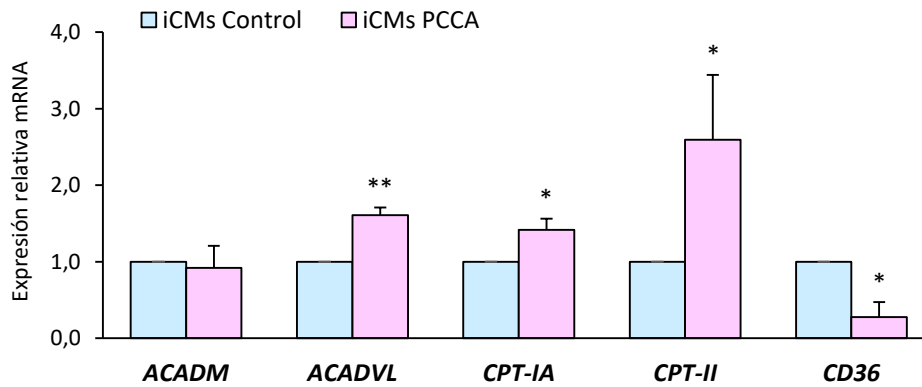
**Figura 48.** Análisis de los niveles de proteínas de los complejos de la CTE en los iCMs. *Western Blot* representativo para la detección de proteínas de los complejos de la CTE, CI (NDUFB8), CII (SDHB), CIII (UQCRC2), CIV (MTCO1) y CV (ATP5A), y de ATP5G en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ ) (**panel A**). Análisis de la expresión mediante qRT-PCR de *MT-ND5* y *MT-CYB* en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa de cada factor respecto a la de GAPDH de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) (**panel B**).

La disminución en la respiración mitocondrial observada en los iCMs del paciente PCCA también podría deberse a una alteración en el proceso de generación de nuevas mitocondrias y, por ello, se planteó la evaluación a nivel de mRNA de algunos genes implicados en la biogénesis mitocondrial en los iCMs generados. Como puede observarse en la **Figura 49**, el análisis de la expresión de varios factores relacionados con este proceso mediante qRT-PCR mostró una disminución significativa del regulador principal de la biogénesis (*PPARGC1A*), de su cofactor (*ESRRA*) y del regulador de la transcripción de genes mitocondriales (*NRF1*) en los iCMs PCCA frente a los Control.



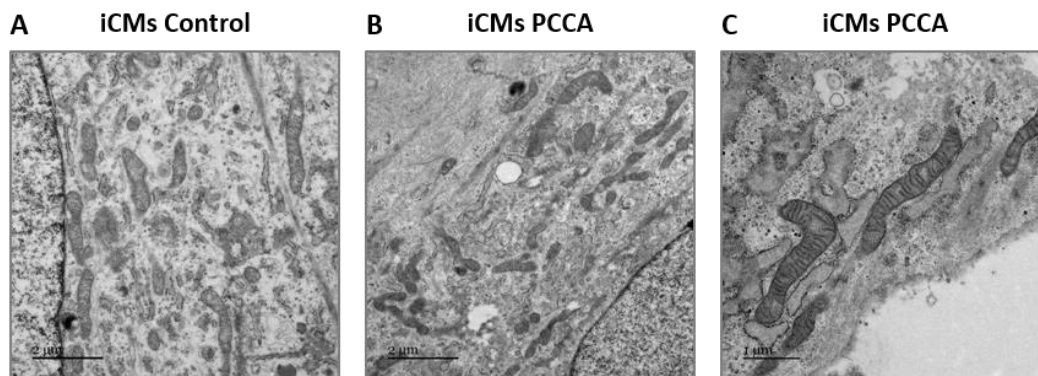
**Figura 49.** Análisis de la expresión de marcadores de la biogénesis mitocondrial en los iCMs. Análisis de la expresión mediante qRT-PCR de *PPARGC1A*, *PPARGC1B*, *PPARA*, *PPARD*, *PPARG*, *TFAM*, *ESRRA* y *NRF1* en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa de cada factor respecto a la de *GAPDH* de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Los PPARs son los reguladores principales de los genes implicados en el metabolismo de lípidos, siendo la proteína PPAR- $\alpha$  la que cumple la función de activación de la oxidación de ácidos grasos en el corazón (Khuchua *et al.*, 2018). Esto es debido a que regula la expresión de diversos genes implicados en el transporte de ácidos grasos a la mitocondria, como el clúster de diferenciación 36 (*CD36*) y las carnitina palmitoiltransferasas (*CPT-IA* y *CPT-II*), y en la oxidación de ácidos grasos, como la acil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena media (*ACADM*) y muy larga (*ACADVL*), entre otros (Schulze *et al.*, 2016). El análisis de la expresión de estos genes a nivel de mRNA mediante qRT-PCR en los iCMs generados mostró un aumento significativo en la expresión de *ACADVL*, *CPT-IA*, *CPT-II* y una disminución de *CD36* en los iCMs del paciente frente a los del control (**Figura 50**).



**Figura 50.** Análisis de la expresión de genes implicados en el metabolismo de lípidos en los iCMs. Análisis de la expresión mediante qRT-PCR de *ACADM*, *ACADVL*, *CPT-1A*, *CPT-1I* y *CD36* en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa de cada factor respecto a la de *GAPDH* de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Posteriormente, se planteó la evaluación de la ultraestructura mitocondrial de los iCMs generados mediante microscopía electrónica ya que se han descrito alteraciones estructurales en las mitocondrias en pacientes AP con cardiomiopatía severa (Schwab *et al.*, 2006, Baruteau *et al.*, 2014). Como puede observarse en la **Figura 51**, no se encontraron alteraciones en la estructura de las mitocondrias de los iCMs del paciente respecto a las del control.

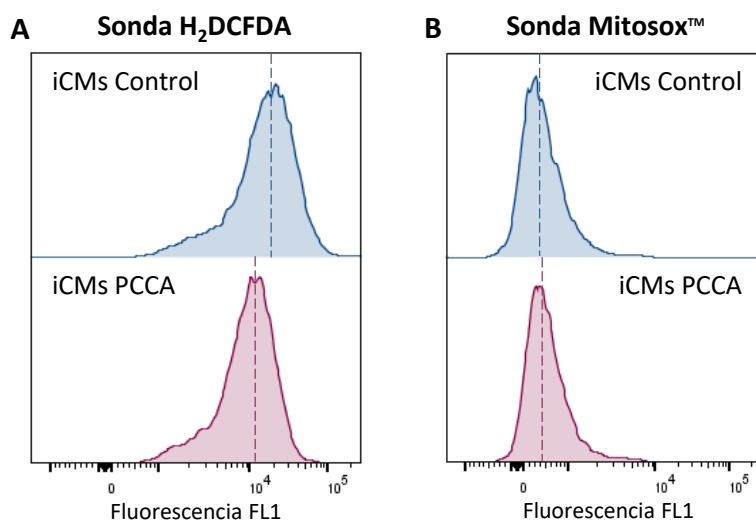


**Figura 51.** Evaluación de la ultraestructura mitocondrial de los iCMs. Imagen representativa de la estructura mitocondrial de los iCMs Control (**panel A**) y PCCA (**panel B**) mediante microscopía electrónica de transmisión; barra de escala: 2  $\mu\text{m}$ . Imagen detallada de la morfología mitocondrial de los iCMs PCCA; barra de escala: 1  $\mu\text{m}$  (**panel C**).

### 3.3.2. Evaluación de la homeostasis redox

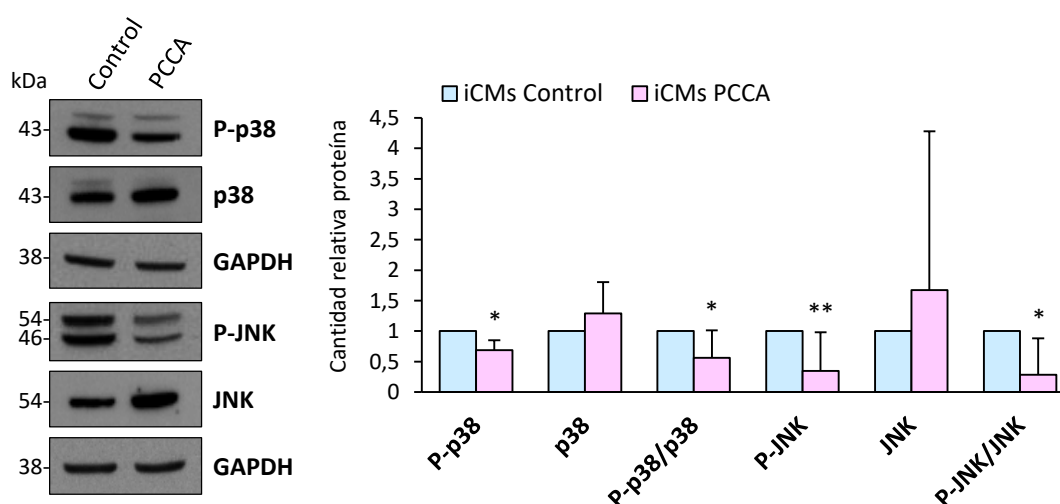
El alto requerimiento de energía para el mantenimiento del latido cardíaco convierte este tejido en especialmente vulnerable al daño oxidativo que puede producirse por aumento de las ROS. Además, hay evidencias que sugieren que las terapias antioxidantes pueden ser de gran ayuda en el tratamiento de las cardiomiopatías (Peoples *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta estas observaciones, se decidió evaluar la homeostasis redox en los iCMs generados utilizando diversas aproximaciones.

En primer lugar, se cuantificaron por citometría de flujo los niveles de ROS intracelulares utilizando la sonda H<sub>2</sub>DCFDA y los niveles de superóxido mitocondrial mediante la sonda Mitosox™. Como muestra la **Figura 52**, los resultados no mostraron diferencias significativas en ninguno de los dos casos entre los iCMs Control y PCCA.



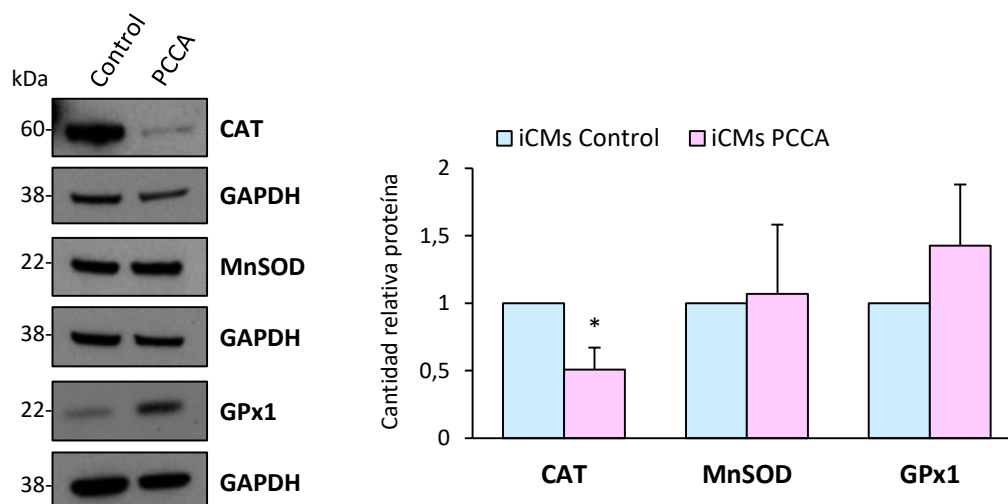
**Figura 52.** Cuantificación de los niveles de ROS en los iCMs. Histograma del análisis por citometría de flujo de los niveles de ROS intracelulares mediante la sonda H<sub>2</sub>DCFDA en los iCMs Control y PCCA (**panel A**) y de los niveles de superóxido mitocondrial mediante la sonda Mitosox™ (**panel B**).

Aunque los datos no indican incremento del estrés oxidativo en los iCMs PCCA en las condiciones analizadas, se decidió examinar también el nivel de las MAPK JNK y p38 ya que participan en procesos esenciales para el mantenimiento de la función celular (Javadov *et al.*, 2014) y, además, se ha confirmado la ausencia de su activación en el corazón del modelo murino de AP (Rivera-Barahona *et al.*, 2017b). Los resultados de este análisis mostraron una disminución significativa de la forma fosforilada y de la ratio de la fosforilada y la total en ambas proteínas, en los iCMs del paciente frente a los del control (**Figura 53**).



**Figura 53.** Análisis de los niveles de las proteínas de estrés en los iCMs. Western Blot representativo para la detección de las formas fosforiladas y totales de p38 y JNK en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

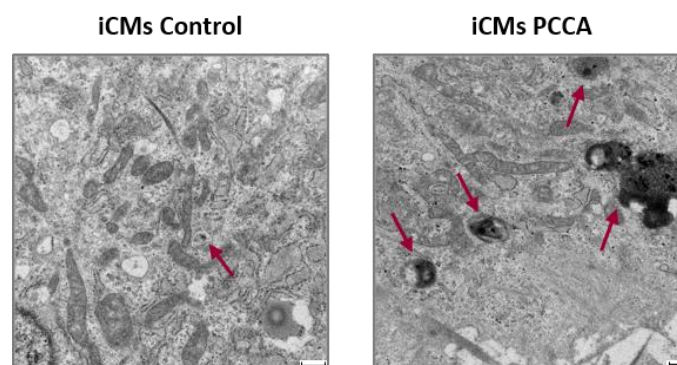
Por último, se analizaron los niveles de las enzimas antioxidantes CAT, MnSOD y GPx1 en los iCMs Control y PCCA. Los resultados por *Western Blot* mostraron una disminución significativa en los niveles de CAT en los iCMs del paciente frente a los del control, mientras que en los niveles de MnSOD y GPx1 no se observaron diferencias significativas (**Figura 54**).



**Figura 54.** Análisis de los niveles de las enzimas antioxidantes en los iCMs. *Western Blot* representativo para la detección de CAT, MnSOD y GPx1 en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ ).

### 3.3.3. Evaluación del proceso de autofagia

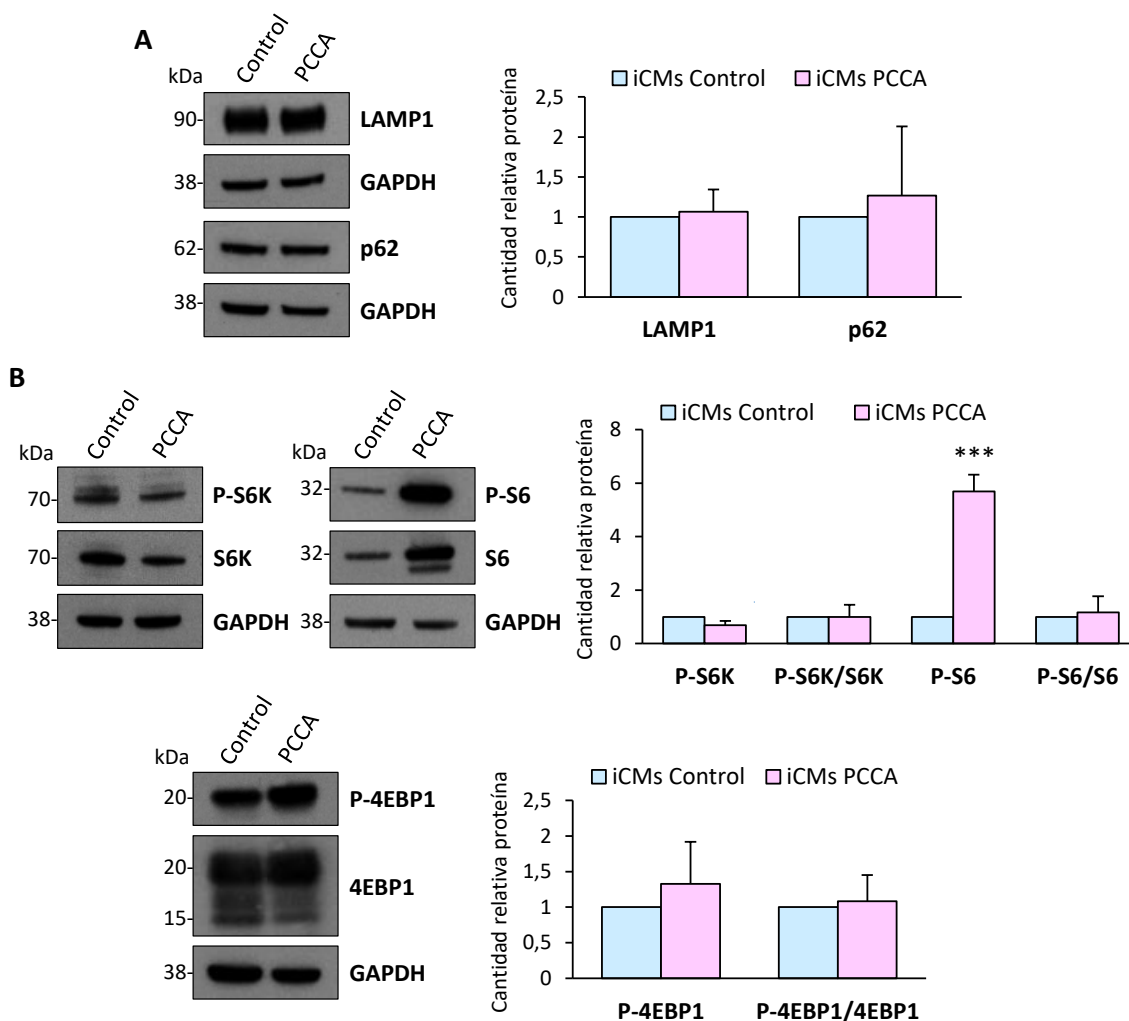
Como se ha indicado anteriormente, en el modelo murino de la enfermedad se ha detectado una alteración en el proceso de autofagia por lo que se planteó llevar a cabo el análisis de este proceso en los iCMs generados. En primer lugar, el estudio por microscopía electrónica reveló un aumento del número y tamaño de vesículas con material de degradación en los iCMs del paciente respecto a los del control (**Figura 55**).



**Figura 55.** Evaluación del proceso de autofagia mediante microscopía electrónica en los iCMs. Imagen representativa del citoplasma de iCMs Control y PCCA; las flechas indican la presencia de vesículas con material de degradación. Barra de escala: 500 nm.



Posteriormente, se analizaron los niveles de algunas proteínas implicadas en el proceso de autofagia y también de proteínas de una de las vías que lo regula, mTORC1. Respecto a la autofagia, los resultados mostraron que no había diferencias en los niveles de proteínas LAMP1 y p62 entre los iCMs del control y del paciente (**Figura 56A**). En el caso de la vía de mTORC1, se observó un aumento significativo en la forma fosforilada de S6 en los iCMs PCCA respecto a los Control, mientras que en las proteínas S6K y 4EBP1 no se observaron cambios (**Figura 56B**).

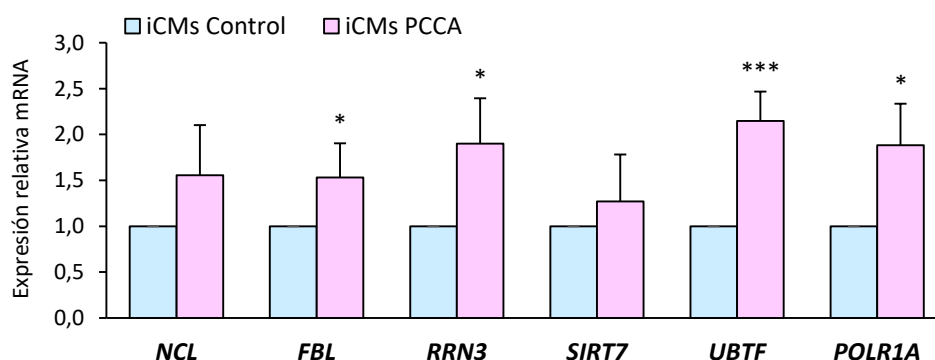


**Figura 56.** Análisis de los niveles de proteínas implicadas en la autofagia y en la ruta de mTORC1 en los iCMs. *Western Blot* representativo para la detección de las proteínas LAMP1 y p62 (**panel A**) y de las formas fosforiladas y totales de S6K, S6 y 4EBP1 (**panel B**) en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\*\*\*) $p < 0,001$ .

### 3.3.4. Evaluación de la biogénesis ribosomal

La proteína S6 forma parte de la subunidad 40S de los ribosomas y su activación es esencial para el inicio de la síntesis de proteínas por parte de los ribosomas (Tavares *et al.*, 2015). Los altos niveles de S6 fosforilada encontrados en los iCMs PCCA podrían relacionarse con un incremento de la biogénesis ribosomal y de la síntesis de proteínas, por lo que se planteó la evaluación de la expresión

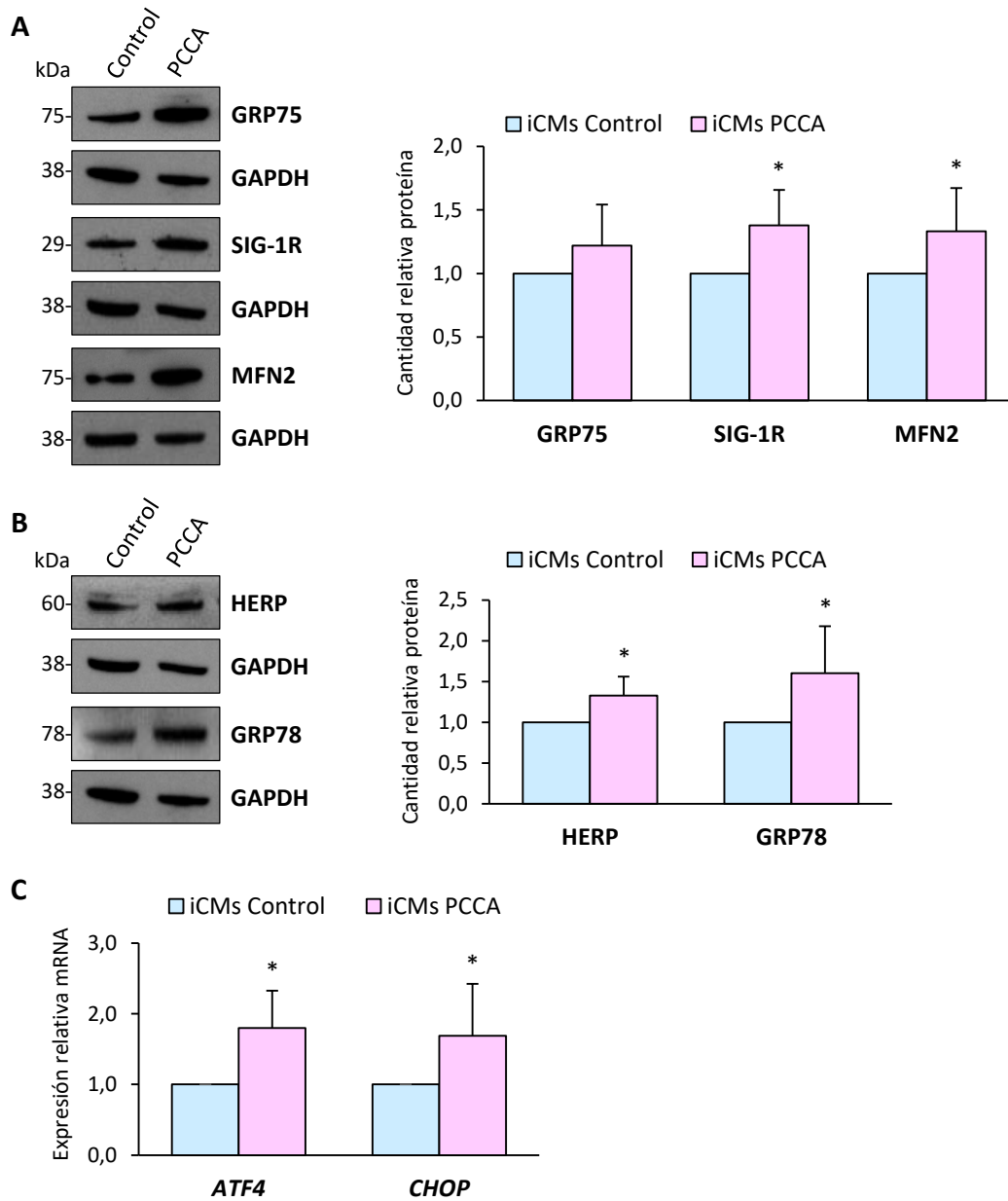
a nivel de mRNA de distintos genes que participan en esta vía como la nucleolina (*NCL*), la metiltransferasa fibrilarina (*FBL*), el factor de transcripción de la polimerasa I (*RRN3*), la sirtuina 7 (*SIRT7*), el factor 1 de transcripción nucleolar (*UBTF*) y la subunidad A de la polimerasa I (*POLR1A*) (Prakash *et al.*, 2019). Como puede observarse en la **Figura 57** los iCMs PCCA presentaron un aumento en la expresión a nivel de transcripción de todos los genes analizados respecto a los del control, siendo significativo para *FBL*, *RRN3*, *UBTF* y *POLR1A*.



**Figura 57.** Análisis de la expresión de marcadores de la biogénesis ribosomal en los iCMs. Análisis de la expresión mediante qRT-PCR de *NCL*, *FBL*, *RRN3*, *SIRT7*, *UBTF* y *POLR1A* en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa de cada factor respecto a la de *GAPDH* de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 3.3.5. Evaluación de la relación entre la mitocondria y el RE

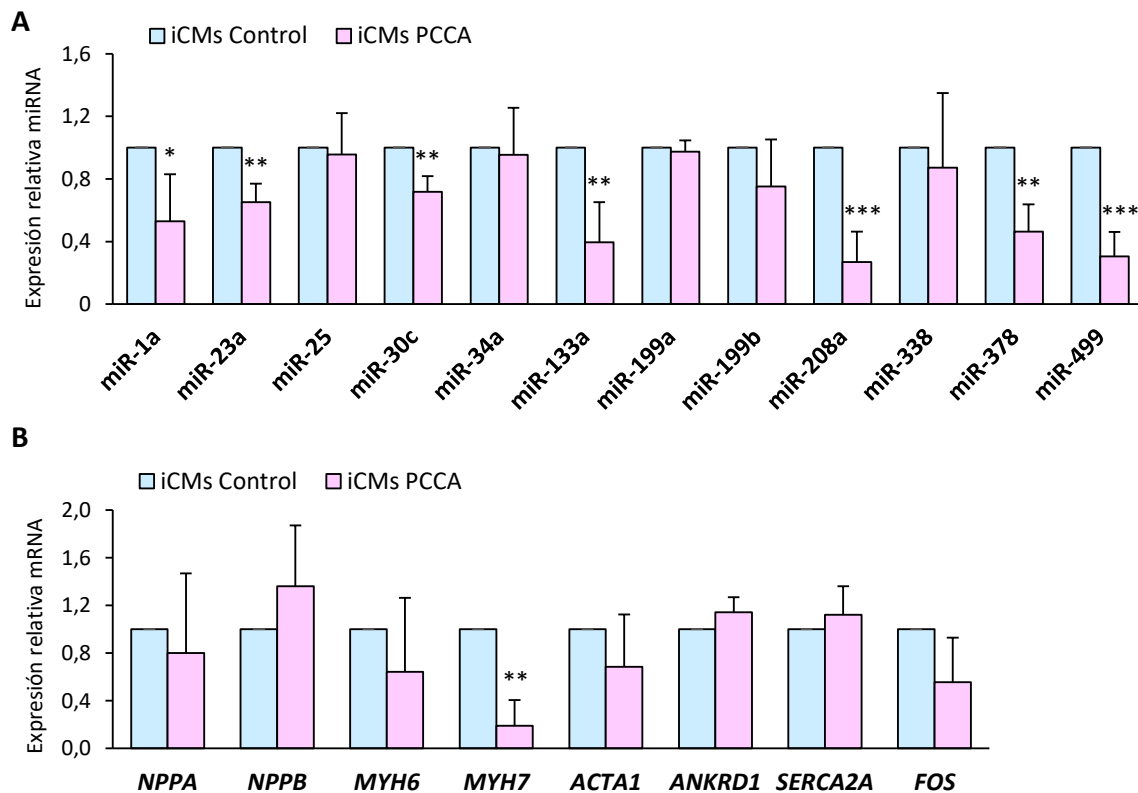
Como se ha comentado anteriormente, las MAMs son las estructuras en las que se produce un estrecho contacto entre las mitocondrias y el RE y cuya función principal es la regulación de la homeostasis del calcio. En el corazón este proceso es fundamental ya que el calcio es la molécula de señalización principal para la regulación del proceso de excitación-contracción en las células cardíacas (Silva-Palacios *et al.*, 2020). Por ello, en este trabajo se planteó el análisis de los niveles de varias proteínas que forman parte de las MAMs, como GRP75, MFN2 y SIG-1R, en los iCMs Control y PCCA. Los resultados mostraron un aumento de los niveles de las tres proteínas en los iCMs del paciente frente a los del control, siendo significativo en el caso de SIG-1R y MFN2 (**Figura 58A**). Estos resultados podrían estar relacionados con un aumento del estrés del RE (Li, J. *et al.*, 2019) y, para profundizar más en este aspecto, se analizaron los niveles de expresión de varias proteínas implicadas en la UPR en los iCMs Control y PCCA. Los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de las proteínas HERP y GRP78 en los iCMs del paciente respecto a los del control (**Figura 58B**) junto a un aumento de la expresión a nivel de mRNA de los genes *ATF4* y *CHOP* (**Figura 58C**).



**Figura 58.** Análisis de los niveles de proteínas de las MAMs y de las implicadas en la respuesta a estrés del RE en los iCMs. *Western Blot* representativo para la detección de las proteínas de las MAMs GRP75, SIG-1R y MFN2 (**panel A**) y de las proteínas de respuesta a estrés del RE HERP y GRP78 (**panel B**) en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda respecto a la de GAPDH de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ ). Análisis de la expresión mediante qRT-PCR de los genes de respuesta a estrés del RE *ATF4* y *CHOP* en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa de cada factor respecto a la de GAPDH de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ ) (**panel C**).

### 3.3.6. Análisis de la expresión de miRNAs y marcadores de daño cardíaco

Por último, se planteó la evaluación de la expresión de distintos miRNAs que ya se habían encontrados desregulados previamente en el corazón del modelo murino hipomorfo de AP (datos del laboratorio). Como puede observarse en la **Figura 59A**, el nivel de expresión de varios miRNAs, como el miR-1a, miR-23a, miR-30c, miR-133a, miR-208a, miR-378 y miR-499, se encontró significativamente disminuido en los iCMs PCCA frente a los Control. Debido a la implicación de estos miRNAs en el desarrollo de cardiomiopatías (Wojciechowska *et al.*, 2017) se analizó la expresión a nivel de mRNA de distintos marcadores de daño cardíaco en los iCMs generados, pero sólo se observó una disminución significativa en la expresión de *MYH7* en los iCMs del paciente respecto a los del control (**Figura 59B**).



**Figura 59.** Análisis de la expresión de miRNAs y de marcadores de daño cardíaco en los iCMs. Análisis de la expresión mediante qRT-PCR del miR-1a, miR-23a, miR-25, miR-30c, miR-34a, miR-133a, miR-199a, miR-199b, miR-208a, miR-338, miR-378 y miR-499 en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa respecto a la de U6 y miR-423-3p de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) (**panel A**). Análisis de la expresión mediante qRT-PCR de los marcadores de daño cardíaco *NPPA*, *NPPB*, *MYH6*, *MYH7*, *ACTA1*, *ANKRD1*, *SERCA2A* y *FOS* en iCMs Control y PCCA. El histograma representa el promedio y la desviación estándar de la expresión relativa de cada factor respecto a la de *GAPDH* de, al menos, 3 experimentos. Análisis estadístico *t* de Student (\*\* $p < 0,01$ ) (**panel B**).

# DISCUSIÓN



---

# Discusión

---

## 1. Estudio de vías que contribuyen a la fisiopatología de AP en el modelo murino hipomorfo

Uno de los aspectos fundamentales para el estudio de las enfermedades raras es el desarrollo de modelos de enfermedad que recapitulen las alteraciones bioquímicas y clínicas de los pacientes, permitiendo así el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas lo cual es esencial ya que, en su mayoría, aún no tienen un tratamiento efectivo (Wangler *et al.*, 2017). Por ello, en el caso de la AP, el desarrollo del modelo murino hipomorfo *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T), con una presentación moderada de la enfermedad (Guenzel *et al.*, 2013), ha supuesto un gran avance en el estudio de esta patología. Nuestro laboratorio ha analizado la función mitocondrial y la homeostasis redox utilizando dicho modelo para identificar nuevas dianas terapéuticas (Gallego-Villar *et al.*, 2016), como las basadas en moléculas antioxidantes (Rivera-Barahona *et al.*, 2017a), que puedan paliar la sintomatología y mejorar la calidad de vida de los pacientes AP.

En un intento de exacerbar el fenotipo del modelo murino, lo que permitiría una mejor evaluación del efecto de tratamientos dirigidos a regular la homeostasis redox y la función mitocondrial, se analizaron muestras de ratones sometidos a una dieta rica en sustratos propionogénicos, como los BCAA y la treonina, enviadas por un grupo colaborador. Esta estrategia se ha empleado para otras enfermedades como los defectos congénitos de la  $\beta$ -oxidación (Schuler *et al.*, 2004) o la acidemia glutárica de tipo I (Zinnanti *et al.*, 2006). Los resultados en este trabajo apenas han mostrado un incremento en la severidad de la enfermedad teniendo en cuenta parámetros de función mitocondrial y homeostasis redox (**Figuras 20-22**), lo que podría explicarse teniendo en cuenta la alta mortalidad observada en los ratones AP tratados debido a un rechazo de la alimentación. Posiblemente, las muestras analizadas, correspondientes solamente a los ratones supervivientes, representen un sesgo hacia fenotipos más suaves. Estas diferencias en la severidad del fenotipo podrían deberse a

variaciones epigenéticas producidas por cambios ambientales (Tejedor y Fraga, 2017) o a variaciones genéticas que son inherentes a cualquier modelo de enfermedad (Dickinson *et al.*, 2016).

Por todo lo anteriormente expuesto, en el resto de experimentos *in vivo* descritos en este trabajo hemos utilizado el modelo murino hipomorfo con dieta estándar y nos hemos centrado en completar su caracterización mediante el estudio de la biogénesis mitocondrial, la expresión de enzimas antioxidantes, el daño oxidativo a proteínas, la muerte celular y el proceso de autofagia, principalmente en el cerebro y en el corazón, ya que son los dos órganos más afectados en la AP y altamente dependientes de la actividad mitocondrial debido a sus altos requerimientos energéticos (Haijes *et al.*, 2019a).

Para estudiar las posibles causas de las alteraciones en el estado bioenergético descritas en el modelo murino (Gallego-Villar *et al.*, 2016), se decidió analizar, en primer lugar, la expresión de varios genes implicados en la biogénesis mitocondrial (Popov, 2020). Los resultados mostraron un patrón de expresión específico de tejido y diferencial según la edad analizada, lo cual concuerda con los resultados obtenidos hasta la fecha de este modelo. En el corazón, a 5 meses de edad, se observó un aumento del regulador principal de la biogénesis mitocondrial, PGC-1 $\alpha$ , lo que sugiere un mecanismo para tratar de mantener el nivel energético celular mediante la generación de nuevas mitocondrias (**Figura 7B**). Sin embargo, a 10 meses de edad, se observó una disminución de la expresión de varios de estos genes (**Figura 8B**) debido, posiblemente, a la imposibilidad de mantener esta activación prolongada en el tiempo o a la falta de una alta demanda energética por la edad tan avanzada. El hígado mostró un patrón de expresión similar a la del corazón, con un claro aumento de la expresión de PGC1- $\alpha$ , así como de otros genes implicados en este proceso, que se revierte a los 10 meses de edad (**Figuras 7C y 8C**). Sin embargo, el cerebro mostró una tendencia a la disminución de la expresión de varios de estos genes en ambas edades (**Figuras 7A y 8A**), indicando una respuesta celular diferente. En un futuro, sería de gran interés analizar los cambios en el transcriptoma para investigar la respuesta celular específica de cada tejido en mayor profundidad y comprender las adaptaciones bioenergéticas que se producen en la AP.

La alteración de la homeostasis redox en el modelo murino de AP se caracteriza por una desregulación tejido-específica de los niveles de algunas enzimas antioxidantes, aumento de las ROS y aparición de daño oxidativo en biomoléculas (Gallego-Villar *et al.*, 2016). Debido a la relevancia de las enzimas antioxidantes en la detoxificación de las ROS (Pizzino *et al.*, 2017), en este trabajo se decidió completar el estudio sobre su expresión en diversos tejidos del ratón a distintas edades. En el corazón de ratones de 5 meses de edad no se observaron diferencias en los niveles de las proteínas MnSOD y CAT (**Figura 9A**) lo que concuerda con lo observado previamente en ratones de 10 meses (Rivera-Barahona *et al.*, 2017a). Sin embargo, hemos observado una disminución significativa en los niveles de GPx1 en el hígado del modelo murino de AP a 10 meses de edad (**Figura 9B**) que

concuera también con lo obtenido en ratones de 5 meses (Gallego-Villar *et al.*, 2016). La GPx1 es una enzima con expresión mayoritariamente hepática y dependiente de selenio (Lei *et al.*, 2016) cuya deficiencia en un modelo murino produce un incremento de la peroxidación lipídica y de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como una reducción de la fosforilación oxidativa (Esposito *et al.*, 2000).

Por otro lado, el aumento del estrés oxidativo tiene un papel relevante sobre la activación de vías del proceso de muerte celular (D'Arcy, 2019), lo que contribuye al desarrollo de diversas patologías como las neurodegenerativas (Singh *et al.*, 2019) y las cardiovasculares (Xu, T. *et al.*, 2019). Sin embargo, pese al aumento de las ROS en el corazón del modelo murino de AP (Gallego-Villar *et al.*, 2016), estudios previos de nuestro laboratorio mostraron una disminución de la apoptosis en este tejido reflejada por la detección de unos niveles reducidos de las proteínas Casp3 y Casp9 que se correlaciona con un aumento de la expresión del miR-133a y miR-378 ya que tienen como diana a estas caspasas (Chen, Y. *et al.*, 2016, Li, Y. *et al.*, 2018). En este trabajo se analizaron los niveles de las caspasas Casp3 y Casp9 en el cerebro del modelo murino, pero no se detectaron diferencias significativas en ninguna de ellas (**Figura 11**). Estos resultados apuntan a la existencia de un mecanismo compensatorio del efecto del aumento del estrés oxidativo ya que en el cerebro de estos ratones se ha encontrado un aumento de la expresión de miRNAs antiapoptóticos como el miR-124, miR-138 y miR-146a (datos no publicados del laboratorio). Existen evidencias que indican que el aumento de la expresión de estos miRNAs tiene un efecto protector sobre las funciones neuronales al prevenir la muerte celular por apoptosis (Zheng y Zhao, 2018, Dehaini *et al.*, 2019, Yang, W. *et al.*, 2019). En concordancia con estas observaciones, que indicarían una menor activación del proceso de muerte celular en el ratón hipomorfo de AP, podemos resaltar el análisis de los niveles de CypD, proteína inductora de la apertura del MPTP, que aparecen disminuidos en el cerebro y corazón de estos ratones (**Figura 12**). Además de su participación en los procesos de muerte celular, recientemente se ha descrito que la CypD tiene una función importante sobre la regulación del metabolismo energético (Porter y Beutner, 2018). Asimismo, se ha descrito que la deficiencia en CypD reestablece la función mitocondrial de la corteza cerebral y el aprendizaje en un modelo de la enfermedad de Alzheimer (Du, H. *et al.*, 2008) y previene la aparición de arritmias cardíacas (Gordan *et al.*, 2016). Por todo ello, la deficiencia en CypD podría entenderse como un mecanismo compensatorio para tratar de regular el metabolismo energético y mantener las funciones esenciales del cerebro y corazón del modelo murino de AP.

En el caso de la AP, como se ha mencionado anteriormente, las cardiomiopatías que aparecen de forma progresiva y tardía suponen una de las mayores causas de mortalidad entre los pacientes (Kovacevic *et al.*, 2020). Hasta la fecha, se han propuesto varios mecanismos fisiopatológicos responsables de las alteraciones del funcionamiento cardíaco, indicados previamente en la introducción. Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que el modelo murino de AP presenta una menor contractilidad marcada por una menor fracción de eyección (Tamayo *et al.*, 2020)



y una elevada expresión de marcadores de DCM como aumento del diámetro y de la masa del ventrículo izquierdo (Fulgencio-Covian *et al.*, 2020), y disfunción sistólica (Tamayo *et al.*, 2020) y diastólica (Fulgencio-Covian *et al.*, 2020). Además, una de las posibles causas de la disfunción cardíaca y las arritmias ventriculares en el modelo murino de AP se ha asociado a un mal manejo del calcio, ocasionado por la disminución de la actividad de SERCA2a al presentar una mayor oxidación debida al aumento del estrés oxidativo en los cardiomiocitos de este modelo (Tamayo *et al.*, 2020).

Teniendo en cuenta estas observaciones, en este trabajo se quiso investigar qué otras vías celulares podrían estar implicadas en el desarrollo de las alteraciones cardíacas en la AP. Tejidos con baja renovación celular, como el corazón, son especialmente dependientes de procesos de control de calidad que se encarguen de la eliminación de proteínas u orgánulos defectuosos (Qiu *et al.*, 2019). Con la edad, se producen una serie de alteraciones en las funciones mitocondriales que dan lugar a un aumento del estrés oxidativo que, mantenido en el tiempo, puede llevar al deterioro de estos procesos esenciales. Uno de estos procesos es la autofagia y, por ello, el hecho de que las cardiomiopatías asociadas a la AP aparezcan frecuentemente de forma progresiva y tardía pone de manifiesto la posible implicación del deterioro de la autofagia en su desarrollo. Nuestros estudios en el corazón del modelo murino de AP apoyan esta hipótesis al demostrar una disminución de la autofagia en el corazón de estos ratones debido a los bajos niveles de la proteína LAMP1 y al aumento de la proteína p62 (**Figura 13**). La alteración del proceso autofágico ha sido ampliamente descrita en diversas enfermedades metabólicas (Ryter *et al.*, 2014, Madrigal-Matute y Cuervo, 2016) ya que tiene un papel fundamental en el control del metabolismo y del estado energético celular (Herzig y Shaw, 2018). Muchas de estas enfermedades, como la diabetes (Tong *et al.*, 2019) o la enfermedad lisosomal de Danon (Nascimbeni *et al.*, 2017), cursan con una disfunción cardíaca asociada a alteraciones en la autofagia, ya que este proceso juega un papel relevante en el correcto desarrollo embrionario del corazón y en el mantenimiento de su actividad a lo largo del tiempo (Mialet-Perez y Vindis, 2017). Modelos murinos deficientes en proteínas que participan en la autofagia desarrollan, entre otras, alteraciones cardíacas. Entre ellos se encuentra el ratón deficiente en *Atg7* que presenta un aumento de la masa cardíaca, fibrosis y biogénesis mitocondrial disminuida (Yan *et al.*, 2017) o el ratón deficiente en *Atg5* que presenta hipertrofia cardíaca y disfunción contráctil junto a niveles elevados de proteínas ubiquitinadas, mitocondrias agregadas y sarcómeros desorganizados (Nakai *et al.*, 2007). Al igual que ocurre en otras enfermedades que se asocian al desarrollo de cardiomiopatías (Huang *et al.*, 2019, Ullrich *et al.*, 2019, Caragnano *et al.*, 2019), la disminución del proceso de autofagia podría contribuir al desarrollo de las arritmias ventriculares, la disfunción diastólica y la DCM observadas en el modelo murino de AP (Tamayo *et al.*, 2020, Fulgencio-Covian *et al.*, 2020).

Una de las principales vías de regulación de la autofagia es la mediada por el complejo mTORC1 que actúa de forma negativa sobre su activación (Boutouja *et al.*, 2019). Los resultados de este trabajo han mostrado un aumento en los niveles de activación de mTORC1 en el corazón de los ratones

hipomorfos (**Figura 14**) que concuerda con los resultados obtenidos sobre la autofagia. La activación de mTORC1, además de tener un efecto negativo sobre la autofagia, también interviene en la activación de la síntesis de proteínas y la biogénesis ribosomal por medio de la fosforilación de las proteínas S6K y 4EBP1 (Boutouja *et al.*, 2019), lo cual podría estar implicado en el remodelado cardíaco que se produce durante la progresión de las cardiomiopatías asociadas a la AP. Además, mTORC1 participa en la activación del factor de transcripción SREBP que favorece la activación de la lipogénesis (Porstmann *et al.*, 2008) de modo que podría ser una de las causas de la presencia de gotas lipídicas observadas en el corazón del modelo murino (Fulgencio-Covian *et al.*, 2020). En el corazón, esta acumulación de lípidos se relaciona con una alteración de la transcripción de genes reguladores del metabolismo y de la biogénesis mitocondrial que puede ocasionar defectos en la contractilidad del corazón (Goldberg *et al.*, 2018).

Con el objetivo de confirmar el efecto de la alteración de la autofagia sobre el fenotipo cardíaco en el modelo murino de AP hemos evaluado el uso de la rapamicina, compuesto natural producido por bacterias actinomicetos, que posee propiedades inmunosupresoras, antitumorales, neuroprotectoras y cardioprotectoras debido a que inhibe la actividad del complejo mTORC1 (Yoo *et al.*, 2017). La rapamicina, o sus análogos, fueron aprobados para el uso como inmunosupresores desde el año 2000 y han resultado efectivos como tratamiento inmunosupresor en los trasplantes hepáticos (Tedesco-Silva *et al.*, 2019) o de corazón (Zuckermann *et al.*, 2018). También se han aprobado como terapia antitumoral (Meng y Zheng, 2015) y se está estudiando su efecto en ensayos clínicos para enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica (Mandrioli *et al.*, 2018). La demostrada eficacia y seguridad de este compuesto ha promovido su uso en otro tipo de enfermedades, como las cardiovasculares, debido a la alta implicación de mTORC1 en su desarrollo y ha resultado ser efectivo para el tratamiento de distintas alteraciones cardíacas en modelos murinos de enfermedad (Das *et al.*, 2014, Fleming *et al.*, 2018, Ma, L. L. *et al.*, 2018). En nuestro modelo murino de AP, este tratamiento también ha resultado beneficioso ya que aumenta los niveles de autofagia (**Figura 17**) y reduce el nivel de activación de mTORC1 (**Figura 18**) y, lo más importante, consigue reducir los niveles de marcadores de daño cardíaco (**Figura 19**). Por ello, el éster de rapamicina conocido como *temsirolimus*, un medicamento aprobado por la FDA con propiedades farmacéuticas más favorables y efectos secundarios leves (Roskoski, 2019), podría ser una buena opción terapéutica para pacientes con AP que exhiben cardiomiopatía.

Por otra parte, en este trabajo se ha planteado la evaluación de la expresión de distintos miRNAs que podrían estar implicados en el desarrollo del fenotipo cardíaco de la AP. En el sistema cardiovascular, la función de los miRNAs es especialmente relevante ya que intervienen en diversos procesos fisiológicos como el crecimiento y contractilidad de los cardiomiocitos, el desarrollo y mantenimiento del ritmo cardíaco, el metabolismo de lípidos y la angiogénesis. Se ha descrito la implicación de diversos miRNAs en el desarrollo de cardiomiopatías como el fallo cardíaco,

arritmias o infartos (Wojciechowska *et al.*, 2017). El nivel de estos miRNAs circulantes puede ser fácilmente cuantificado y, potencialmente, podrían ser utilizados como biomarcadores de patologías cardíacas o como indicadores de la efectividad de un tratamiento (Shah *et al.*, 2017). Además, podrían ser usados como dianas terapéuticas mediante la restauración o la inhibición de su función (Rupaimoole y Slack, 2017). Sin embargo, todavía hay ciertas limitaciones que impiden su uso como biomarcadores de forma rutinaria como son la complejidad de sus mecanismos regulatorios, la ubicuidad de la expresión de algunos miRNAs y la falta de protocolos normalizados para su extracción y cuantificación (Zhou *et al.*, 2018). En el caso de las terapias basadas en miRNAs, es necesario implementar las estrategias para que se realice una entrada segura y estable de forma tejido-específica y evitando la aparición de *off-targets* (Rupaimoole y Slack, 2017).

Estudios previos en el modelo murino de AP se centraron en caracterizar el patrón de expresión de diversos miRNAs relacionados con funciones clave en procesos como la apoptosis, la función mitocondrial o la respuesta a estrés oxidativo en distintos tejidos del ratón (Rivera-Barahona *et al.*, 2017b). Para completar este estudio, en este trabajo se ha realizado el análisis de la expresión de la familia de miRNAs miR-199a-5p y miR-199b-5p ya que se ha descrito su implicación en el control de la autofagia, el metabolismo celular y el remodelado cardíaco (Wang, Q. *et al.*, 2019). Como ocurre en la mayoría de los miRNAs analizados en el modelo murino, el miR-199a muestra una expresión diferencial en el tejido cardíaco dependiendo de la edad analizada, siendo a 5 meses donde se observa un incremento mayor (**Figura 15**). Se ha descrito que el miR-199a tiene un efecto negativo sobre el proceso de la autofagia que se debe a la inhibición directa de GSK3 $\beta$  por parte de este miRNA. De este modo, un aumento de la expresión del miR-199a produciría un aumento de la actividad de mTORC1 y una disminución de la autofagia (Li, Z. *et al.*, 2017), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Por otro lado, los niveles del otro componente de esta familia, el miR-199b, que participa en la activación de la señalización mediada por NFAT/CaN (da Costa Martins *et al.*, 2010), también se encuentran muy elevados en el corazón del modelo murino hipomorfo a los 5 meses de edad (**Figura 16**), lo que podría contribuir, en parte, a la fibrosis y a la disfunción sistólica y diastólica observadas en nuestro modelo de AP (Fulgencio-Covian *et al.*, 2020, Tamayo *et al.*, 2020), como se ha descrito en otro modelo murino con sobreexpresión de este miRNA (Duygu *et al.*, 2017).

Otra de las dianas del miR-199a es el receptor PPAR- $\beta/\delta$  (el Azzouzi *et al.*, 2013), por lo que un aumento en la expresión del miR-199a produciría una disminución de la expresión de *Ppard*, lo cual coincide con lo observado en el corazón del modelo murino de AP (**Figura 7B**). PPAR- $\beta/\delta$  es el regulador principal del metabolismo lipídico y tiene un papel fundamental en el cambio metabólico que se produce durante el fallo cardíaco (Han *et al.*, 2017). En el individuo adulto, el continuo bombeo del corazón requiere unas altas cantidades de energía que se producen, en un 70%, por la oxidación de ácidos grasos mientras que la glucosa, el lactato o los cuerpos cetónicos son fuentes

menores de energía. Sin embargo, el corazón fetal se sustenta, principalmente, por el metabolismo anaerobio de la glucosa y el lactato. En condiciones de daño cardíaco se produce una reversión a este estado fetal caracterizado por la re-expresión de genes fetales, disminución de la oxidación de ácidos grasos y aumento de la producción de energía por el metabolismo de la glucosa debido, en parte, a la acción de PPAR- $\beta/\delta$  (Palomer *et al.*, 2016). El tejido cardíaco de un modelo murino *knockout* para *Ppard* presenta una disminución en la expresión de genes relacionados con la  $\beta$ -oxidación lipídica, acumulación de lípidos, hipertrofia y disfunción cardíaca (Cheng *et al.*, 2004) y alteraciones en los mecanismos de defensa antioxidantes y la biogénesis mitocondrial (Wang, P. *et al.*, 2010). Asimismo, un modelo inducible para *Ppard* ha mostrado aumento de la biogénesis mitocondrial, del mtDNA y de los niveles de enzimas antioxidantes, así como de la función cardíaca (Liu *et al.*, 2011). Todas estas observaciones indican que, en el modelo murino hipomorfo de AP, la disminución de la expresión de *Ppard* podría tener un papel relevante en la acumulación lipídica y la disfunción cardíaca observadas en este modelo.

En conclusión, este trabajo ha permitido, por un lado, completar el estudio de las vías moleculares relacionadas con función mitocondrial, homeostasis redox y muerte celular en el modelo murino de AP. Por otro lado, ha descrito la alteración del proceso autofágico como otro posible mecanismo que contribuye al desarrollo de cardiomiopatías en la AP y ha demostrado el potencial efecto beneficioso que la rapamicina, o derivados de la misma, podrían tener para el tratamiento de esta enfermedad. Y finalmente, ha puesto de manifiesto la posible implicación de la desregulación de los miR-199a y miR-199b sobre la función cardíaca en el modelo murino hipomorfo debido a la alteración de procesos biológicos esenciales como la autofagia y el metabolismo de lípidos. En el futuro, estudios centrados en el análisis de la función cardíaca tras el tratamiento con rapamicina, así como tratamientos dirigidos contra estos miRNAs o hacia la activación de PPAR- $\beta/\delta$  podrían constituirse como estrategias terapéuticas viables para los pacientes AP.

## 2. Generación y caracterización de nuevos modelos celulares basados en iPSCs para el estudio de la AP

Como se ha indicado anteriormente, el desarrollo del modelo murino hipomorfo de AP (Guenzel *et al.*, 2013) ha supuesto un gran avance para el estudio de esta enfermedad metabólica ayudándonos a comprender la fisiopatología y a evaluar el efecto de nuevas terapias; pero, como cualquier modelo murino, presenta ciertas limitaciones además del alto coste de mantenimiento y de las implicaciones éticas derivadas del uso de un gran número de animales (Hartung, 2008). Aunque la similitud entre el genoma murino y humano es muy elevada, se han descrito diferencias tanto a nivel genómico (retrotrasposones, reordenamientos genéticos y diferencias en secuencias no codificantes) como a nivel de regulación de la expresión génica (*splicing* alternativo, actividad de los *enhancers* o modificaciones postraduccionales) (Breschi *et al.*, 2017). Esto se traduce en variaciones a nivel de composición y abundancia de los diferentes tipos celulares en órganos complejos o en diferencias en las funciones metabólicas o inmunológicas (Rydell-Tormanen y Johnson, 2019) lo cual genera una gran variabilidad en la interpretación de los resultados. Además, los modelos murinos poseen una farmacología y toxicocinética distinta a los humanos (Hartung, 2008) por lo que muchas veces no suponen un buen modelo para la predicción de la seguridad, toxicidad o efectos secundarios de un compuesto (Wendler y Wehling, 2010).

Actualmente, en los ensayos preclínicos de fármacos se recomienda el uso de modelos *in vitro* con un contexto celular humano y, en este sentido, las células iPSCs presentan ciertas ventajas ya que proporcionan el fondo genético del paciente y suponen una fuente ilimitada de material biológico para el estudio de la fisiopatología y la efectividad de los tratamientos (Karagiannis *et al.*, 2019). Para crear nuevos modelos celulares de enfermedad en la AP, en este trabajo se han generado de forma exitosa dos líneas de iPSCs mediante la reprogramación de los fibroblastos de dos pacientes con mutaciones en los genes *PCCA* y *PCCB*. El método elegido para la reprogramación ha sido el basado en el virus Sendai ya que presenta una serie de ventajas frente a otros procedimientos: (i) es un vector seguro ya que no es un virus patogénico para los humanos; (ii) es un virus no integrativo que se replica en el citoplasma con lo que el material genético viral se diluye tras sucesivos pases en cultivo; (iii) puede infectar diversos tipos celulares ya que su entrada está mediada por el receptor del ácido siálico; y (iv) presenta una alta eficiencia de reprogramación (Haridhasapavalan *et al.*, 2019). Nuestros resultados han evidenciado la seguridad y eficacia del método utilizado para generar dos líneas de iPSCs, *PCCA* y *PCCB*, genética y genómicamente estables, pluripotentes y con capacidad de diferenciación *in vitro* a las tres capas germinales (**Figuras 24-35**). Esta caracterización es necesaria para poder llevar a cabo su registro en el Banco Nacional de Líneas Celulares del ISCIII y para poder comparar de forma imparcial y objetiva los resultados obtenidos al trabajar con varias líneas iPSCs diferentes (Marti *et al.*, 2013).

## 2.1| Generación de iAs y iNs para el estudio de las alteraciones neurológicas en la AP

Las complicaciones neurológicas como convulsiones, trastornos del movimiento, anormalidades de los ganglios basales, síntomas extrapiramidales, atrofia cerebral, etc., son frecuentes en la AP y, aunque a menudo se asocian con el número de crisis metabólicas que experimentan los pacientes, es probable que haya un daño adicional como resultado de otros mecanismos fisiopatológicos (Wajner, 2019). Como ya se ha comentado, nuestro laboratorio ha descrito la implicación de la disfunción mitocondrial, alteración de la homeostasis redox y desregulación de miRNAs en el desarrollo de estas alteraciones a nivel molecular en el modelo murino hipomorfo de AP (Gallego-Villar *et al.*, 2016, Rivera-Barahona *et al.*, 2017b).

Hasta la fecha, se han elaborado múltiples protocolos de diferenciación de las iPSC a iNs o iAs o, incluso, por inducción directa desde los fibroblastos del paciente, que permiten la obtención de células con características similares a las presentes en el individuo adulto (Mertens *et al.*, 2018). Esto ha permitido el modelaje de diversas enfermedades neurodegenerativas y el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos para su tratamiento (Wu, Y. Y. *et al.*, 2019). Con objeto de poder caracterizar el fenotipo celular neurológico de la AP en un contexto humano, en este trabajo se han generado dos nuevos modelos celulares humanos de enfermedad basados en la diferenciación de las iPSCs PCCA a iAs y iNs GABAérgicas.

Un porcentaje alto de los pacientes AP desarrollan alteraciones neurológicas, especialmente en el estriado, que se detectan por resonancia magnética y son las responsables de las alteraciones en el movimiento (Pena *et al.*, 2012). Se postula que el estriado puede ser una de las zonas más afectadas por su alto requerimiento energético y su alta vulnerabilidad al estrés oxidativo. Además, estudios previos han mostrado un aumento del GABA extracelular mediado por la inhibición que produce el propionato sobre la enzima encargada de su degradación (Morland *et al.*, 2018), lo que sugiere una alteración en la actividad sináptica mediada por GABA. Por ello, en este trabajo hemos elegido un protocolo (Yang, N. *et al.*, 2017) que permite la generación de una población heterogénea de neuronas exclusivamente GABAérgicas, que son de las que se compone mayoritariamente el estriado (Calabresi *et al.*, 2014). Es importante resaltar la importancia de los cocultivos de neuronas y astrocitos para conseguir un fenotipo neuronal más maduro y aumentar la supervivencia celular (Odawara *et al.*, 2014). También se han observado cambios a nivel de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas ya que, cultivadas en presencia de los astrocitos, presentan una frecuencia mayor de generación de potenciales de acción y la población se encuentra más sincronizada eléctricamente (Kayama *et al.*, 2018). Hasta ahora, los astrocitos utilizados en los cocultivos eran los obtenidos a partir de muestras de ratones o ratas (Odawara *et al.*, 2014), pero el desarrollo de protocolos que permiten la rápida generación de iAs a partir de iPSCs humanas ha

permitido su uso rutinario para la generación de modelos de enfermedad más fiables. Esto ha supuesto un gran avance para la investigación ya que los astrocitos humanos presentan grandes diferencias respecto a los del ratón tanto a nivel estructural como de funcionalidad (Zhang *et al.*, 2019). En el caso de la AP, se postula que los astrocitos pueden ser especialmente vulnerables a los efectos de la acumulación del propionil-CoA ya que, aunque el propionato entra en las células por medio de transportadores de monocarboxilatos que se encuentran presentes tanto en neuronas como en células gliales, la conversión del propionato en propionil-CoA mitocondrial solo se produce en las células gliales (Nguyen *et al.*, 2007). Además, los astrocitos son especialmente vulnerables a los daños producidos por aumento de los niveles de amonio (Heidari, 2019), lo cual es un rasgo bioquímico común en los pacientes AP, especialmente al producirse crisis metabólicas (Haberle *et al.*, 2018). Por ello, en este trabajo hemos elegido un protocolo de generación de iAs que permite la obtención de una población homogénea con características similares a las de los astrocitos humanos adultos (Canals *et al.*, 2018).

Una vez comprobado que los iAs e iNs generados expresaban marcadores específicos de astrocitos y neuronas, respectivamente (**Figuras 37 y 38**), quisimos comenzar a evaluar su perfil bioenergético. El cerebro es un órgano muy activo que utiliza el 20% de la glucosa y el oxígeno consumidos en el organismo, aunque, en determinadas condiciones, también puede utilizar los cuerpos cetónicos como sustrato energético (Jha y Morrison, 2018). Las mitocondrias neuronales son especialmente susceptibles al estrés oxidativo ya que poseen un metabolismo energético muy alto y, por lo tanto, se generan grandes cantidades de ROS. Además, contienen muchos ácidos grasos insaturados que son especialmente vulnerables a las ROS y, durante su oxidación, se genera un subproducto que puede inhibir la función de proteínas como las de la CTE (Raefsky y Mattson, 2017). Estas alteraciones pueden llevar a la activación de procesos de muerte celular que contribuyen a la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Chi *et al.*, 2018), a los procesos inflamatorios del cerebro (Morris *et al.*, 2018) y al desarrollo del cerebro inmaduro (Robertson *et al.*, 2009). Nuestros resultados del análisis de la OCR mostraron una menor tasa de respiración mitocondrial en las iNs del paciente respecto a varios de los parámetros analizados en comparación con los del control (**Figura 40**), posiblemente debida al efecto negativo de la acumulación de metabolitos tóxicos y ROS sobre la función de los complejos de la CTE (Wongkittichote *et al.*, 2017). Sin embargo, los iAs del paciente no han mostrado diferencias significativas respecto a los del control en ninguno de los parámetros relacionados con la respiración mitocondrial analizados (**Figura 39**). Esto podría deberse a las diferencias en su perfil metabólico ya que las neuronas obtienen la energía, predominantemente, por el metabolismo oxidativo de la glucosa mientras que los astrocitos lo hacen por glicolisis (Magistretti y Allaman, 2015). Aunque los astrocitos poseen mitocondrias, normalmente no son activas en la producción de energía ya que, en condiciones basales, se ha observado una inhibición

de la enzima que regula la entrada del piruvato al ciclo de Krebs, etapa esencial para el inicio de la respiración mitocondrial (Halim *et al.*, 2010).

Para comprobar las propiedades electrofisiológicas de las iNs generadas se utilizaron cocultivos de 4 semanas de diferenciación que mostraron que los cocultivos Control y PCCA mostraban propiedades pasivas similares (**Figura 41**) lo cual nos permite comparar entre ellas los resultados obtenidos. Para evaluar el efecto de la ausencia de PCC sobre las corrientes GABAérgicas se analizaron las PSCs GABAérgicas mediante la inhibición de los receptores de glutamato NMDA y AMPA y, para confirmar que se trataban de corrientes producidas exclusivamente por el neurotransmisor GABA, se usó un inhibidor del receptor de GABA. Los resultados preliminares mostraron una amplitud y tiempo de decaimiento similares en ambos casos, mientras que la frecuencia de las PSCs GABAérgicas en los cocultivos PCCA aparece disminuida, aunque de forma no significativa, frente a los Control (**Figura 42**). La falta de significancia estadística en este experimento podría deberse al bajo número de réplicas biológicas analizadas, con lo que sería conveniente repetirlo con un mayor número de muestras. Estos resultados sugieren que las iNs PCCA podrían tener reducida la formación de sinapsis, como se ha descrito que sucede en otras enfermedades con deficiencias cognitivas, como Parkinson (Zhai *et al.*, 2018), enfermedad de Alzheimer (Pickett *et al.*, 2018) o esclerosis lateral amiotrófica (Henstridge *et al.*, 2018). La menor formación de sinapsis en las iNs PCCA podría deberse a la deficiencia en el metabolismo energético ya que la mayor parte de la energía consumida por el cerebro se destina a la actividad eléctrica de las neuronas. Patologías que se caracterizan por un metabolismo energético disminuido muestran alteraciones en la excitabilidad neuronal y en la transmisión sináptica y, generalmente, presentan síntomas como discapacidad intelectual, convulsiones, desórdenes del movimiento, etc. (Oyarzabal y Marin-Valencia, 2019). Por otro lado, sería interesante realizar los mismos análisis en cocultivos con un mayor tiempo de diferenciación, ya que se ha descrito que la maduración de las sinapsis sucede de forma progresiva y cultivos de 7 semanas de diferenciación presentan mayor frecuencia y amplitud de las PSCs GABAérgicas (Yang, N. *et al.*, 2017).

En resumen, en este trabajo se han generado de forma exitosa dos nuevos modelos celulares humanos de AP que van a permitir el estudio en mayor profundidad de las alteraciones neurológicas de esta enfermedad. Estudios preliminares han mostrado una deficiencia en el metabolismo energético en las iNs del paciente que se correlaciona, aparentemente, con una menor formación de sinapsis. Estudios futuros son necesarios para una mejor caracterización del perfil bioenergético y de la homeostasis redox en los iAs e iNs generados, así como evaluar los niveles de neurotransmisores y la calidad y funcionalidad de las sinapsis.



## 2.2| Generación de iCMs para el estudio de las alteraciones cardíacas en la AP

Como se ha comentado anteriormente, el desarrollo del modelo murino hipomorfo (Guenzel *et al.*, 2013) ha supuesto un buen modelo para el estudio de la fisiopatología de la AP permitiendo la caracterización de algunos aspectos relacionados con la patología cardíaca (Fulgencio-Covian *et al.*, 2020, Gallego-Villar *et al.*, 2016, Rivera-Barahona *et al.*, 2017b, Tamayo *et al.*, 2020). Sin embargo, los modelos murinos presentan limitaciones, aparte de las ya indicadas, en el estudio de las alteraciones cardíacas ya que el corazón de los ratones difiere considerablemente del humano tanto a nivel estructural (Wessels y Sedmera, 2003) como a nivel de frecuencia del ritmo cardíaco (en ratones es de 400-600 latidos/minuto), manejo del calcio y corrientes iónicas (Breckenridge, 2010). Otra de las diferencias más importantes consiste en que los ratones poseen una mayor tasa metabólica y una mayor producción de ROS que se correlaciona con cambios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos que afectan al sistema cardiovascular (Perlman, 2016, Rydell-Tormanen y Johnson, 2019). También hay diferencias en la composición de las isoformas de las miosinas cardíacas ya que en ratones la forma predominante es la  $\alpha$ -MHC y en humanos, la  $\beta$ -MHC (Nakamura y Sadoshima, 2018). Por otro lado, en los estudios con ratones es importante tener en cuenta el sexo ya que se han descrito diferencias a nivel de expresión de canales, de frecuencia de latido y de la duración del potencial de acción en función de si son hembras o machos (Blenck *et al.*, 2016).

Con el objetivo de generar modelos celulares humanos para el estudio de las patologías cardíacas asociadas a la AP, en este trabajo se ha llevado a cabo la diferenciación de iPSCs de dos pacientes AP a iCMs utilizando un protocolo ampliamente validado (Lian *et al.*, 2013). La línea de iPSCs PCCA proviene de un paciente AP que aún no ha desarrollado ninguna sintomatología cardíaca, mientras que el paciente de la línea PCCB desarrolló DCM desde la infancia. Por ello, una vez comprobada la correcta diferenciación de ambas líneas (**Figura 44**) se planteó llevar a cabo la caracterización molecular y funcional para poder establecer diferencias entre ellas. En este trabajo, solamente se ha realizado la caracterización de los iCMs PCCA pero, en un futuro próximo, se completará el estudio analizando los mismos parámetros en la línea PCCB.

La evaluación del perfil bioenergético de los iCMs PCCA mostró una disminución de la respiración mitocondrial respecto a los del control en varios de los parámetros analizados (**Figuras 46 y 47**). Este resultado puede estar relacionado con el cambio metabólico que se produciría durante el desarrollo de alteraciones cardíacas y que consiste en la reducción de la producción de energía por parte de la mitocondria y el aumento del metabolismo anaeróbico glucolítico (Ulmer y Eschenhagen, 2020). Sin embargo, el análisis del nivel de proteínas de complejos que forman parte de la CTE codificados por el DNA nuclear, no mostró diferencias, exceptuando la ATP5G, cuyos niveles aparecen disminuidos en los iCMs del paciente (**Figura 48A**). Cabe destacar que el análisis de la

expresión a nivel de mRNA de dos genes que forman parte de los complejos CI y CIII y que se encuentran codificados en el mtDNA sí que mostraron una disminución de la expresión en los iCMs PCCA (**Figura 48B**). Este resultado podría deberse a una depleción del mtDNA como la observada en tejidos de pacientes (Yano *et al.*, 2003, Schwab *et al.*, 2006, de Keyzer *et al.*, 2009) y en el corazón del modelo murino (Gallego-Villar *et al.*, 2016), por lo que sería necesario realizar más estudios para confirmar esta hipótesis.

La disminución de la fosforilación oxidativa y de la expresión de genes de la CTE puede deberse a una menor tasa de biogénesis mitocondrial que viene determinada por una disminución de la expresión de genes clave para este proceso como *PPARGCIA*, *ESRRA* y *NRF1* en los iCMs del paciente (**Figura 49**). Se ha descrito que PGC-1 $\alpha$  tiene un papel cardioprotector en condiciones de estrés ya que modelos murinos deficientes en esta proteína no muestran alteraciones mitocondriales en condiciones basales, pero en condiciones de estrés como en sobrecarga de presión, se produce una aceleración de la disfunción cardíaca debido a una menor función y biogénesis mitocondrial (Arany *et al.*, 2006). Además, se ha descrito que la señalización PGC-1/ERR aparece disminuida en corazones humanos en las etapas finales de fallo cardíaco mostrando disfunción metabólica y menor capacidad oxidativa (Gupte *et al.*, 2014). En modelos de fallo cardíaco también se ha observado una disminución del metabolismo de lípidos que viene determinada por una menor actividad del eje PGC-1/PPAR (Schulze *et al.*, 2016); sin embargo, en los iCMs del paciente esto no se ha confirmado ya que el análisis de la expresión de distintos genes implicados en el metabolismo de lípidos ha mostrado un incremento a nivel de mRNA de la mayoría de ellos (**Figura 50**), quizás debido al estadio preliminar de maduración de los cardiomiocitos generados (ver más abajo).

En cuanto a la evaluación de la homeostasis redox, el análisis de los niveles de ROS en los iCMs PCCA no mostró aumento ni de las ROS intracelulares generales ni del superóxido mitocondrial (**Figura 52**). En concordancia con estos resultados, en los iCMs PCCA no se ha observado un incremento de la activación de la ruta de estrés mediada por JNK y p38 respecto a los iCMs Control (**Figura 53**). Por otro lado, el análisis de los niveles de enzimas antioxidantes mostró una disminución de CAT en los iCMs PCCA mientras que no se observaron diferencias en los niveles de GPx1 y MnSOD (**Figura 54**). Una menor expresión de CAT en el tejido cardíaco se relaciona con la aparición de cardiomiopatías asociadas a diabetes (Wang, X. *et al.*, 2017) e hipertensión (Movahed *et al.*, 2012). En un futuro, sería interesante estudiar la homeostasis redox en los iCMs del paciente PCCB, que presenta cardiomiopatía, para poder comparar y comprender en mayor profundidad estos resultados.

El análisis por microscopía electrónica de los iCMs generados reveló un aumento de vesículas con material de degradación en los iCMs PCCA (**Figura 55**), lo que podría sugerir una alteración del proceso autofágico como hemos descrito que sucede en el modelo murino de AP. Sin embargo,

el análisis del nivel de proteínas de los marcadores autofágicos p62 y LAMP1 no ha mostrado diferencias entre los iCMs PCCA y Control (**Figura 56A**) lo que concuerda con los resultados obtenidos sobre la vía de mTORC1, ya que solo aparece aumentado el nivel de proteína S6 fosforilada en los iCMs del paciente (**Figura 56B**). Esta proteína es indispensable para que se lleve a cabo el inicio de la síntesis de proteínas en los ribosomas (Tavares *et al.*, 2015) y, por ello, en este trabajo se llevó a cabo el análisis a nivel de expresión de mRNA de distintos factores implicados en la biogénesis ribosomal, lo que mostró un aumento de la expresión de todos los genes analizados (**Figura 57**). La biogénesis ribosomal constituye el proceso más complejo y regulado de una célula por lo que alteraciones en cualquiera de sus etapas produce consecuencias fatales en el organismo (Piazzi *et al.*, 2019). La función ribosomal tiene un papel fisiológico relevante para el desarrollo de la musculatura del organismo pero, su activación exacerbada, puede llevar a fenotipos patológicos como la hipertrofia muscular esquelética (Figueiredo y McCarthy, 2019). Alteraciones en este proceso también se han asociado con el desarrollo de patologías como la isquemia/reperfusión cardíaca (Cao *et al.*, 2017) o las cardiomiopatías asociadas a diabetes (Zhao *et al.*, 2017), por lo que el aumento de la biogénesis ribosomal en nuestro modelo celular de AP podría tener un papel relevante en el remodelado cardíaco asociado a patología.

En el tejido cardíaco, el RE forma una estructura específica conocida como retículo sarcoplásmico (RS) que tiene un papel fundamental en la regulación de las corrientes de calcio (Silva-Palacios *et al.*, 2020). Por ello, alteraciones en el RS son causantes de la aparición de arritmias debido a un aumento de la sensibilidad del calcio que produce una disminución de la duración de los potenciales de acción y de la amplitud de la corriente de calcio sistólica (Smith y Eisner, 2019). Los resultados de este trabajo han mostrado un aumento de los niveles de proteínas que forman parte de las MAMs en los iCMs del paciente (**Figura 58A**) indicando una desregulación de las interacciones entre las mitocondrias y el RS que podría estar afectando a las corrientes de calcio y, por tanto, a la contractilidad. Estudios futuros para el análisis de los niveles de calcio nos proporcionarán información acerca de la posible alteración de la homeostasis del calcio en los iCMs del paciente. Además, las MAMs tienen un papel relevante en el control de las funciones metabólicas ya que influyen en la activación de enzimas del ciclo de Krebs y de la respiración mitocondrial, por lo que su alteración está relacionada con el desarrollo de diversas enfermedades metabólicas (Tubbs y Rieusset, 2017). De hecho, se ha descrito que el aumento de las MAMs induce la aparición de cardiomiopatías en modelos murinos de diabetes por la alteración de la homeostasis del calcio y la disfunción mitocondrial (Wu, S. *et al.*, 2019). En concordancia con estos resultados, también hemos observado un aumento del nivel de proteínas y de la expresión de genes implicados en la respuesta a estrés del RE, la UPR, en los iCMs del paciente (**Figuras 58B y 58C**). La activación de esta respuesta produce cambios transcripcionales y postraduccionales que conllevan la reducción de la síntesis

global de proteínas, el aumento del ensamblaje de proteínas en el RE y la degradación de proteínas mal plegadas de forma que puede alterarse la función y contractilidad cardíaca (Li, J. *et al.*, 2019).

Por último, el análisis de la expresión de distintos miRNAs que regulan funciones importantes de la fisiología cardíaca mostró una disminución de la expresión de los miRNAs miR-1a, miR-133a, miR-30c, miR-23a, miR-378, miR-208a y miR-499 en los iCMs PCCA (**Figura 59A**). Modelos de fallo cardíaco se caracterizan por una disminución de la expresión de los miR-1a, miR-133a y miR-30c, entre otros (Raut *et al.*, 2016, Wojciechowska *et al.*, 2017). Los bajos niveles de los miR-1a y miR-133a se relacionan con alteraciones en la actividad cardíaca que dan lugar a la aparición de arritmias y, además, destacan por su papel cardioprotector ya que son antihipertróficos, antifibróticos y antiinflamatorios (Luo *et al.*, 2018, Kambis *et al.*, 2019). Sin embargo, el miR-23a está implicado en la inducción de la hipertrofia y la apoptosis en el tejido cardíaco (Du, J. *et al.*, 2019) con lo que la disminución de su expresión podría tener un efecto cardioprotector. Y, en el caso del miR-378, se ha descrito que, entre otras funciones, actúa como regulador negativo de la respuesta a estrés del RE (Wang, Y. *et al.*, 2018) por lo que la disminución de su expresión en los iCMs PCCA podría ser responsable, en parte, del aumento del estrés del RE observado. Estos resultados coinciden, en parte, con los obtenidos en muestras de plasma de pacientes AP (Fulgencio-Covian *et al.*, 2020, Rivera-Barahona *et al.*, 2017b), que difieren de los obtenidos en el corazón del modelo murino, donde la mayoría de estos miRNAs aparecen aumentados (Fulgencio-Covian *et al.*, 2020). Estas diferencias podrían deberse a los distintos mecanismos de regulación génica que poseen ratones y humanos (Breschi *et al.*, 2017). Por otro lado, el análisis de la expresión de distintos marcadores relacionados con fallo cardíaco no mostró diferencias, exceptuando *Myh7* que presentó una expresión disminuida en los iCMs PCCA (**Figura 59B**) que podría deberse a la disminución de la expresión del miR-208a ya que es el encargado de regular su expresión, y que se correlaciona también con niveles de expresión disminuidos del miR-499 (van Rooij *et al.*, 2009).

Por último, es interesante resaltar que la mayor limitación del uso de iCMs para el modelaje de enfermedades es que los protocolos actuales, aunque poseen una alta eficiencia, producen iCMs con un bajo nivel de maduración que se refleja en sus propiedades electrofisiológicas y ultraestructurales y en que poseen un metabolismo mayoritariamente glucolítico (Machiraju y Greenway, 2019). Pese a ello, los iCMs se han utilizado de forma exitosa para el modelaje de distintas enfermedades cardiovasculares como arritmias, DCM y cardiomiopatías asociadas a enfermedades mitocondriales (Chun *et al.*, 2018, Ulmer y Eschenhagen, 2020). En la actualidad se están desarrollando numerosos protocolos para mejorar la maduración de los iCMs basados en la estimulación eléctrica del cultivo, crecimiento sobre diferentes sustratos, desarrollo de cultivos en 3D, activación de vías de señalización importantes para la cardiomiogénesis, etc. (Machiraju y Greenway, 2019). En nuestro laboratorio se está poniendo a punto un protocolo de maduración basado en la suplementación del medio de cultivo con hormona tiroidea T3 y dexometasona y el posterior crecimiento de los iCMs

en líneas de *Matrigel*® de 0,4-0,8 mm de grosor (datos no mostrados) (Feaster *et al.*, 2015, Parikh *et al.*, 2017). Además, se quiere implementar otro protocolo basado en la suplementación del medio de cultivo con Torin1 que es un inhibidor de la vía de mTOR (Garbern *et al.*, 2020). Una vez puestos a punto estos protocolos, se repetirán los experimentos aquí expuestos para completar el estudio en cardiomiocitos maduros.

En conclusión, este trabajo ha permitido la generación de dos nuevos modelos celulares humanos que van a permitir el estudio a nivel celular de vías implicadas en el desarrollo de las cardiomiopatías asociadas a la AP y el testaje de nuevas aproximaciones terapéuticas en un fondo genético humano paciente-específico. Además, la caracterización de los iCMs PCCA ha revelado la posible implicación de la disfunción mitocondrial y del RE, la alteración de la expresión de distintos miRNAs y la desregulación de la biogénesis mitocondrial y ribosomal en el desarrollo de las alteraciones cardíacas. Estudios futuros para analizar las propiedades electrofisiológicas y las corrientes iónicas en los iCMs generados son necesarios para completar su caracterización, así como el análisis de nuevas terapias basadas en el uso de compuestos que aumenten la biogénesis o la función mitocondrial.

# CONCLUSIONES



- 1** Los análisis realizados en el modelo murino hipomorfo de AP han permitido completar el estudio sobre la implicación de la disfunción mitocondrial y la homeostasis redox en el desarrollo de esta patología.
- 2** La reprogramación de fibroblastos de pacientes AP ha permitido la obtención de dos líneas de iPSCs portadoras de mutaciones en los genes *PCCA* y *PCCB* que cumplen con los criterios morfológicos, moleculares y funcionales de células pluripotentes, así como de estabilidad genética y genómica.
- 3** La diferenciación de las iPSCs a iCMs, iAs y iNs GABAérgicas ha permitido la obtención de nuevos modelos celulares humanos relevantes para el estudio de las alteraciones cardíacas y neurológicas asociadas a la AP que suponen una herramienta indispensable para el análisis de nuevos compuestos terapéuticos.
- 4** Nuestros resultados han profundizado en los mecanismos moleculares relacionados con las alteraciones cardíacas y neurológicas, tanto en el modelo animal como en los celulares, identificando nuevos procesos implicados en la fisiopatología de la AP que, en un futuro, podrían considerarse como posibles dianas terapéuticas.
- 5** El tratamiento con rapamicina en el modelo murino de AP ha mostrado efectos beneficiosos sobre el proceso de autofagia y el daño cardíaco por lo que este compuesto, o sus derivados, podrían considerarse buenos candidatos para prevenir o retrasar el desarrollo de las alteraciones cardíacas asociadas a esta enfermedad.

# CONCLUSIONS





- 1** The analyses performed in the hypomorphic murine model of PA have completed the study about the involvement of mitochondrial dysfunction and redox homeostasis in the pathophysiology of this disease.
- 2** The reprogramming of PA patients' fibroblasts has permitted the generation of two iPSCs lines with mutations in *PCCA* and *PCCB* genes that meet the morphological, molecular and functional characteristics of pluripotent cells, along with genetic and genomic stability.
- 3** iPSCs differentiation to iCMs, iAs and GABAergic iNs has proved to be an efficient method for obtaining new human disease models relevant for the study of cardiac and neurological alterations related to PA and for the analysis of new therapeutic compounds.
- 4** Our results have provided deeper insight into the molecular mechanisms related to cardiac and neurological alterations, both in the murine and cellular models, identifying novel pathological pathways underlying disease progression that, in the future, may be considered as therapeutic targets.
- 5** Rapamycin treatment in the PA murine model has proved to have a beneficial effect reverting the autophagic alterations and cardiac damage. This compound, or its derivatives, may be an attractive therapeutic option for the prevention or the delay of PA-related cardiac alterations.

# BIBLIOGRAFÍA



**A**gana, M., Frueh, J., Kamboj, M., Patel, D. R. y Kanungo, S. (2018): "Common metabolic disorder (inborn errors of metabolism) concerns in primary care practice", *Annals of Translational Medicine*, Vol. 6, n° 24, pp. 469-477.

Aguer, C., Gambarotta, D., Mailloux, R. J., Moffat, C., Dent, R., McPherson, R. y Harper, M. E. (2011): "Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells", *PloS One*, Vol. 6, n° 12, pp. e28536.

Anderson, R. G., Ghiraldeli, L. P. y Pardee, T. S. (2018): "Mitochondria in cancer metabolism, an organelle whose time has come?", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1870, n°1, pp. 96-102.

Annesley, S. J. y Fisher, P. R. (2019): "Mitochondria in Health and Disease", *Cells*, Vol 8, n°7, pp. 680-687.

Arany, Z., Novikov, M., Chin, S., Ma, Y., Rosenzweig, A. y Spiegelman, B. M. (2006): "Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 103, n° 26, pp. 10086-10091.

Auburger, G., Klinkenberg, M., Drost, J., Marcus, K., Morales-Gordo, B., Kunz, W. S., Brandt, U., Broccoli, V., Reichmann, H., Gispert, S. y Jendrach, M. (2012): "Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease", *Molecular Neurobiology*, Vol. 46, n° 1, pp. 20-27.

**B**acakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., Kasalkova, N. S., Svorcik, V., Kolska, Z., Motarjemi, H. y Molitor, M. (2018): "Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-

derived stem cells - a review", *Biotechnology Advances*, Vol. 36, n° 4, pp. 1111-1126.

Bagchi, R. A. y Weeks, K. L. (2019): "Histone deacetylases in cardiovascular and metabolic diseases", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 130, pp. 151-159.

Barker-Haliski, M. y White, H. S. (2015): "Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy", *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, Vol. 5, n° 8, pp. a022863.

Baruteau, J., Hargreaves, I., Krywawych, S., Chalasani, A., Land, J. M., Davison, J. E., Kwok, M. K., Christov, G., Karimova, A., Ashworth, M., Anderson, G., Prunty, H., Rahman, S. y Grunewald, S. (2014): "Successful reversal of propionic acidemia associated cardiomyopathy: evidence for low myocardial coenzyme Q10 status and secondary mitochondrial dysfunction as an underlying pathophysiological mechanism", *Mitochondrion*, Vol. 17, pp. 150-156.

Belenguer, P., Duarte, J. M. N., Schuck, P. F. y Ferreira, G. C. (2019): "Mitochondria and the Brain: Bioenergetics and Beyond", *Neurotoxicity Research*, Vol. 36, pp. 219-238.

Bhatti, J. S., Bhatti, G. K. y Reddy, P. H. (2017): "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies" *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1863, n°5, pp. 1066-1077.

Blenck, C. L., Harvey, P. A., Reckelhoff, J. F. y Leinwand, L. A. (2016): "The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease", *Circulation Research*, Vol. 118, n° 8, pp. 1294-1312.

Bock, F. J. y Tait, S. W. G. (2020): "Mitochondria as multifaceted regulators of

cell death", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 21, n° 2, pp. 85-100.

Bodi, I., Grunert, S. C., Becker, N., Stoelzle-Feix, S., Spiekerkoetter, U., Zehender, M., Bugger, H., Bode, C. y Odening, K. E. (2016): "Mechanisms of acquired long QT syndrome in patients with propionic academia", *Heart Rhythm*, Vol. 13, n° 6, pp. 1335-1345.

Bohnen, M. S., Peng, G., Robey, S. H., Terrenoire, C., Iyer, V., Sampson, K. J. y Kass, R. S. (2017): "Molecular Pathophysiology of Congenital Long QT Syndrome", *Physiological Reviews*, Vol. 97, n° 1, pp. 89-134.

Boutouja, F., Stiehm, C. M. y Platta, H. W. (2019): "mTOR: A Cellular Regulator Interface in Health and Disease", *Cells*, Vol. 8, n° 1, pp. 18-41.

Breckenridge, R. (2010): "Heart failure and mouse models", *Disease Models and Mechanisms*, Vol. 3, n° 3-4, pp. 138-143.

Breschi, A., Gingeras, T. R. y Guigo, R. (2017): "Comparative transcriptomics in human and mouse", *Nature Reviews Genetics*, Vol. 18, n° 7, pp. 425-440.

**C**alabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V. y Di Filippo, M. (2014): "Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal", *Nature Neuroscience*, Vol. 17, n°8, pp. 1022-1030.

Canals, I., Ginisty, A., Quist, E., Timmerman, R., Fritze, J., Miskinyte, G., Monni, E., Hansen, M. G., Hidalgo, I., Bryder, D., Bengzon, J. y Ahlenius, H. (2018): "Rapid and efficient induction of functional astrocytes from human pluripotent stem cells", *Nature Methods*, Vol. 15, n° 9, pp. 693-696.

Cao, Y., Bojjireddy, N., Kim, M., Li, T., Zhai, P., Nagarajan, N., Sadoshima, J.,

Palmiter, R. D. y Tian, R. (2017): "Activation of gamma2-AMPK Suppresses Ribosome Biogenesis and Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury", *Circulation Research*, Vol. 121, n° 10, pp. 1182-1191.

Caragnano, A., Aleksova, A., Bulfoni, M., Cervellin, C., Rolle, I. G., Veneziano, C., Barchiesi, A., Mimmi, M. C., Vascotto, C., Finato, N., Sponga, S., Livi, U., Isola, M., Di Loreto, C., Bussani, R., Sinagra, G., Cesselli, D. y Beltrami, A. P. (2019): "Autophagy and Inflammasome Activation in Dilated Cardiomyopathy", *Journal of Clinical Medicine*, Vol. 8, n° 10, pp. 1519-1538.

Chen, F., Wen, X., Lin, P., Chen, H., Wang, A. y Jin, Y. (2019): "HERP depletion inhibits zearalenone-induced apoptosis through autophagy activation in mouse ovarian granulosa cells", *Toxicology Letters*, Vol. 301, pp. 1-10.

Chen, Y., Sun, P., Bai, W. y Gao, A. (2016): "MiR-133a regarded as a potential biomarker for benzene toxicity through targeting Caspase-9 to inhibit apoptosis induced by benzene metabolite (1,4-Benzoquinone)", *The Science of the Total Environment*, Vol. 571, pp. 883-891.

Cheng, L., Ding, G., Qin, Q., Huang, Y., Lewis, W., He, N., Evans, R. M., Schneider, M. D., Brako, F. A., Xiao, Y., Chen, Y. E. y Yang, Q. (2004): "Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy", *Nature Medicine*, Vol. 10, n° 11, pp. 1245-1250.

Chernorudskiy, A. L. y Zito, E. (2017): "Regulation of Calcium Homeostasis by ER Redox: A Close-Up of the ER/Mitochondria Connection", *Journal of Molecular Biology*, Vol. 429, n° 5, pp. 620-632.

Chi, H., Chang, H. Y. y Sang, T. K. (2018): "Neuronal Cell Death Mechanisms in Major

Neurodegenerative Diseases", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19, n° 10, pp. 3082-3100.

Chinopoulos, C. (2018): "Mitochondrial permeability transition pore: Back to the drawing board", *Neurochemistry International*, Vol. 117, pp. 49-54.

Chun, Y. W., Durbin, M. D. y Hong, C. C. (2018): "Genome Editing and Induced Pluripotent Stem Cell Technologies for Personalized Study of Cardiovascular Diseases", *Current Cardiology Reports*, Vol. 20, n° 6, pp. 38-47.

Collard, R., Majtan, T., Park, I. y Kraus, J. P. (2018): "Import of TAT-Conjugated Propionyl Coenzyme a Carboxylase Using Models of Propionic Acidemia", *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 38, n° 6, pp. e00491-17

Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C. y Foti, M. (2019): "Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20, n° 24, pp. 6249-6271

Cortez, M. A., Anfossi, S., Ramapriyan, R., Menon, H., Atalar, S. C., Aliru, M., Welsh, J. y Calin, G. A. (2019): "Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer", *Genes, Chromosomes and Cancer*, Vol. 58, n° 4, pp. 244-253.

Cotrina, M. L., Ferreira, S. y Schneider, P. (2019): "High prevalence of self-reported autism spectrum disorder in the Propionic Acidemia Registry", *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports*, Vol. 51, n° 1, pp. 70-75.

**D**a Costa Martins, P. A., Salic, K., Gladka, M. M., Armand, A. S., Leptidis, S., el Azzouzi, H., Hansen, A., Coenen-de Roo, C. J., Bierhuizen, M. F., van der Nagel, R., van

Kuik, J., de Weger, R., de Bruin, A., Condorelli, G., Arbones, M. L., Eschenhagen, T. y De Windt, L. J. (2010): "MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling", *Nature Cell Biology*, Vol. 12, n° 12, pp. 1220-1227.

D'Arcy, M. S. (2019): "Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy", *Cell Biology International*, Vol. 43, n° 6, pp. 582-592.

Darvish-Damavandi, M., Ho, H. K. y Kang, T. S. (2016): "Towards the development of an enzyme replacement therapy for the metabolic disorder propionic acidemia", *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, Vol. 8, pp. 51-60.

Das, A., Durrant, D., Koka, S., Salloum, F. N., Xi, L. y Kukreja, R. C. (2014): "Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition with rapamycin improves cardiac function in type 2 diabetic mice: potential role of attenuated oxidative stress and altered contractile protein expression", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 289, n° 7, pp. 4145-4160.

De Keyzer, Y., Valayannopoulos, V., Benoist, J. F., Batteux, F., Lacaille, F., Hubert, L., Chretien, D., Chadeffaux-Vekemans, B., Niaudet, P., Touati, G., Munnich, A. y de Lonlay, P. (2009): "Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria", *Paediatric Research*, Vol. 66, n° 1, pp. 91-95.

Dehaini, H., Awada, H., El-Yazbi, A., Zouein, F. A., Issa, K., Eid, A. A., Ibrahim, M., Badran, A., Baydoun, E., Pintus, G. y Eid, A. H. (2019): "MicroRNAs as Potential Pharmacotargets in Ischemia-Reperfusion Injury Compounded by Diabetes", *Cells*, Vol. 8, n° 2, pp. 152-171.

- Del Re, D. P., Amgalan, D., Linkermann, A., Liu, Q. y Kitsis, R. N. (2019): "Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease", *Physiological Reviews*, Vol. 99, n° 4, pp. 1765-1817.
- Denton, D. y Kumar, S. (2019): "Autophagy-dependent cell death", *Cell death and Differentiation*, Vol. 26, n° 4, pp. 605-616.
- Desviat, L. R., Perez, B., Perez-Cerda, C., Rodriguez-Pombo, P., Clavero, S. y Ugarte, M. (2004): "Propionic acidemia: mutation update and functional and structural effects of the variant alleles", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 83, n° 1-2, pp. 28-37.
- Desviat, L. R., Sanchez-Alcudia, R., Perez, B., Perez-Cerda, C., Navarrete, R., Vijzelaar, R. y Ugarte, M. (2009): "High frequency of large genomic deletions in the PCCA gene causing propionic acidemia", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 96, n° 4, pp. 171-176.
- Dickinson, M. E., Flenniken, A. M., Ji, X., Teboul, L., Wong, M. D., White, J. K., Meehan, T. F., Weninger, W. J., Westerberg, H., Adissu, H., Baker, C. N., Bower, L., Brown, J. M., Caddle, L. B., Chiani, F., Clary, D., Cleak, J., Daly, M. J., Denegre, J. M., Doe, B., Dolan, M. E., Edie, S. M., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Galli, A., Gambadoro, A., Gallegos, J., Guo, S., Horner, N. R., Hsu, C. W., Johnson, S. J., Kalaga, S., Keith, L. C., Lanoue, L., Lawson, T. N., Lek, M., Mark, M., Marschall, S., Mason, J., McElwee, M. L., Newbigging, S., Nutter, L. M., Peterson, K. A., Ramirez-Solis, R., Rowland, D. J., Ryder, E., Samocha, K. E., Seavitt, J. R., Selloum, M., Szoke-Kovacs, Z., Tamura, M., Trainor, A. G., Tudose, I., Wakana, S., Warren, J., Wendling, O., West, D. B., Wong, L., Yoshiki, A., International Mouse Phenotyping Consortium, Jackson Laboratory, Infrastructure Nationale PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris (ICS), Charles River Laboratories, MRC Harwell, Toronto Centre for Phenogenomics, Wellcome Trust Sanger Institute, RIKEN BioResource Center, MacArthur, D. G., Tocchini-Valentini, G. P., Gao, X., Flicek, P., Bradley, A., Skarnes, W. C., Justice, M. J., Parkinson, H. E., Moore, M., Wells, S., Braun, R. E., Svenson, K. L., de Angelis, M. H., Herault, Y., Mohun, T., Mallon, A. M., Henkelman, R. M., Brown, S. D., Adams, D. J., Lloyd, K. C., McKerlie, C., Beaudet, A. L., Bucan, M. y Murray, S. A. (2016): "High-throughput discovery of novel developmental phenotypes", *Nature*, Vol. 537, n° 7621, pp. 508-514.
- Dimitrov, B., Molema, F., Williams, M., Schmiesing, J., Muhlhausen, C., Baumgartner, M. R., Schumann, A. y Kolker, S. (2020): "Organic acidurias: major gaps, new challenges, and a yet unfulfilled promise", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Online Version.
- Dorn, G. W., Vega, R. B. y Kelly, D. P. (2015): "Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart", *Genes and Development*, Vol. 29, n° 19, pp. 1981-1991.
- Doss, M. X. y Sachinidis, A. (2019): "Current Challenges of iPSC-Based Disease Modelling and Therapeutic Implications", *Cells*, Vol. 8, n° 5, pp. 403-419.
- Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., Yan, Y., Wang, C., Zhang, H., Molkentin, J. D., Gunn-Moore, F. J., Vonsattel, J. P., Arancio, O., Chen, J. X. y Yan, S. D. (2008): "Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease", *Nature Medicine*, Vol. 14, n° 10, pp. 1097-1105.
- Du, J., Hang, P., Pan, Y., Feng, B., Zheng, Y., Chen, T., Zhao, L. y Du, Z. (2019): "Inhibition of miR-23a attenuates doxorubicin-induced mitochondria-dependent

cardiomyocyte apoptosis by targeting the PGC-1alpha/Drp1 pathway", *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 369, pp. 73-81.

Duygu, B., Poels, E. M., Juni, R., Bitsch, N., Ottaviani, L., Olieslagers, S., de Windt, L. J. y da Costa Martins, P. A. (2017): "miR-199b-5p is a regulator of left ventricular remodelling following myocardial infarction", *Non-coding RNA Research*, Vol. 2, n° 1, pp. 18-26.

**E**l Azzouzi, H., Leptidis, S., Dirkx, E., Hoeks, J., van Bree, B., Brand, K., McClellan, E. A., Poels, E., Sluimer, J. C., van den Hoogenhof, M. M., Armand, A. S., Yin, X., Langley, S., Bourajjaj, M., Olieslagers, S., Krishnan, J., Vooijs, M., Kurihara, H., Stubbs, A., Pinto, Y. M., Krek, W., Mayr, M., da Costa Martins, P. A., Schrauwen, P. y De Windt, L. J. (2013): "The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a approximately 214 targets myocardial PPARdelta and impairs mitochondrial fatty acid oxidation", *Cell Metabolism*, Vol. 18, n° 3, pp. 341-354.

Engle, S. J., Blaha, L. y Kleiman, R. J. (2018): "Best Practices for Translational Disease Modelling Using Human iPSC-Derived Neurons", *Neuron*, Vol. 100, n° 4, pp. 783-797.

Eposito, L. A., Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Cottrell, B., MacGregor, G. R. y Wallace, D. C. (2000): "Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 28, n° 5, pp. 754-766.

**F**easter, T. K., Cadar, A. G., Wang, L., Williams, C. H., Chun, Y. W., Hempel, J. E., Bloodworth, N., Merryman, W. D., Lim, C. C., Wu, J. C., Knollmann, B. C. y Hong, C. C. (2015): "Matrigel Mattress: A Method for the Generation of Single Contracting Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived

Cardiomyocytes", *Circulation Research*, Vol. 117, n° 12, pp. 995-1000.

Figueiredo, V. C. y McCarthy, J. J. (2019): "Regulation of Ribosome Biogenesis in Skeletal Muscle Hypertrophy", *Physiology*, Vol. 34, n° 1, pp. 30-42.

Fleming, N. D., Samsa, L. A., Hassel, D., Qian, L. y Liu, J. (2018): "Rapamycin attenuates pathological hypertrophy caused by an absence of trabecular formation", *Scientific Reports*, Vol. 8, n° 1, pp. 8584-8594.

Fragaki, K., Cano, A., Benoist, J. F., Rigal, O., Chaussonot, A., Rouzier, C., Bannwarth, S., Caruba, C., Chabrol, B. y Paquis-Flucklinger, V. (2011): "Fatal heart failure associated with CoQ10 and multiple OXPHOS deficiency in a child with propionic acidemia", *Mitochondrion*, Vol. 11, n° 3, pp. 533-536.

Fraser, J. L. y Venditti, C. P. (2016): "Methylmalonic and propionic acidemias: clinical management update", *Current Opinion in Pediatrics*, Vol. 28, n° 6, pp. 682-693.

Fulgencio-Covian, A., Alonso-Barroso, E., Guenzel, A. J., Rivera-Barahona, A., Ugarte, M., Perez, B., Barry, M. A., Perez-Cerda, C., Richard, E. y Desviat, L. R. (2020): "Pathogenic implications of dysregulated miRNAs in propionic acidemia related cardiomyopathy", *Translational Research: the journal of laboratory and clinical medicine*, Vol. 218, pp. 43-56.

**G**allego-Villar, L., Perez, B., Ugarte, M., Desviat, L. R. y Richard, E. (2014): "Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 452, n° 3, pp. 457-461.

Gallego-Villar, L., Perez-Cerda, C., Perez, B., Abia, D., Ugarte, M., Richard, E. y

- Desviat, L. R. (2013): "Functional characterization of novel genotypes and cellular oxidative stress studies in propionic acidemia", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol. 36, n° 5, pp. 731-740.
- Gallego-Villar, L., Rivera-Barahona, A., Cuevas-Martin, C., Guenzel, A., Perez, B., Barry, M. A., Murphy, M. P., Logan, A., Gonzalez-Quintana, A., Martin, M. A., Medina, S., Gil-Izquierdo, A., Cuezva, J. M., Richard, E. y Desviat, L. R. (2016): "In vivo evidence of mitochondrial dysfunction and altered redox homeostasis in a genetic mouse model of propionic acidemia: Implications for the pathophysiology of this disorder", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 96, pp. 1-12.
- Garbern, J. C., Helman, A., Sereda, R., Sarikhani, M., Ahmed, A., Escalante, G. O., Ogurlu, R., Kim, S. L., Zimmerman, J. F., Cho, A., MacQueen, L., Bezzerides, V. J., Parker, K. K., Melton, D. A. y Lee, R. T. (2020): "Inhibition of mTOR Signaling Enhances Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells via p53-Induced Quiescence", *Circulation*, Vol. 141, n° 4, pp. 285-300.
- Goldberg, I. J., Reue, K., Abumrad, N. A., Bickel, P. E., Cohen, S., Fisher, E. A., Galis, Z. S., Granneman, J. G., Lewandowski, E. D., Murphy, R., Olive, M., Schaffer, J. E., Schwartz-Longacre, L., Shulman, G. I., Walther, T. C. y Chen, J. (2018): "Deciphering the Role of Lipid Droplets in Cardiovascular Disease: A Report from the 2017 National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop", *Circulation*, Vol. 138, n° 3, pp. 305-315.
- Gordan, R., Fefelova, N., Gwathmey, J. K. y Xie, L. H. (2016): "Involvement of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in cardiac arrhythmias: Evidence from cyclophilin D knockout mice", *Cell Calcium*, Vol. 60, n° 6, pp. 363-372.
- Grilo, A. L. y Mantalaris, A. (2019): "Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective", *Biotechnology Advances*, Vol. 37, n° 3, pp. 459-475.
- Grotto, S., Sudrie-Arnaud, B., Drouin-Garraud, V., Nafeh-Bizet, C., Chadefaux-Vekemans, B., Gobin, S., Bekri, S. y Tebani, A. (2018): "Dilated Cardiomyopathy and Premature Ovarian Failure Unveiling Propionic Aciduria", *Clinical Chemistry*, Vol. 64, n° 4, pp. 752-754.
- Gudipaty, S. A., Conner, C. M., Rosenblatt, J. y Montell, D. J. (2018): "Unconventional Ways to Live and Die: Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 34, pp. 311-332.
- Guenzel, A. J., Collard, R., Kraus, J. P., Matern, D. y Barry, M. A. (2015): "Long-term sex-biased correction of circulating propionic acidemia disease markers by adeno-associated virus vectors", *Human Gene Therapy*, Vol. 26, n° 3, pp. 153-160.
- Guenzel, A. J., Hofherr, S. E., Hillestad, M., Barry, M., Weaver, E., Venezia, S., Kraus, J. P., Matern, D. y Barry, M. A. (2013): "Generation of a hypomorphic model of propionic acidemia amenable to gene therapy testing", *Molecular Therapy*, Vol. 21, n° 7, pp. 1316-1323.
- Gupte, A. A., Hamilton, D. J., Cordero-Reyes, A. M., Youker, K. A., Yin, Z., Estep, J. D., Stevens, R. D., Wenner, B., Ilkayeva, O., Loebe, M., Peterson, L. E., Lyon, C. J., Wong, S. T., Newgard, C. B., Torre-Amione, G., Taegtmeier, H. y Hsueh, W. A. (2014): "Mechanical unloading promotes myocardial energy recovery in human heart failure", *Circulation: Cardiovascular Genetics*, Vol. 7, n° 3, pp. 266-276.



Gureev, A. P., Shaforostova, E. A. y Popov, V. N. (2019): "Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction Between the Nrf2 and PGC-1alpha", *Signaling Pathways*, Vol. 10, pp. 435-447.

**H**aberle, J., Chakrapani, A., Ah Mew, N. y Longo, N. (2018): "Hyperammonaemia in classic organic acidaemias: a review of the literature and two case histories", *Orphanet Journal of Rare Diseases*, Vol. 13, n° 1, pp. 219-226.

Haijes, H. A., Jans, J. J. M., Tas, S. Y., Verhoeven-Duif, N. y van Hasselt, P. M. (2019a): "Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 1: Complications", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol. 42, n° 5, pp. 730-744.

Haijes, H. A., van Hasselt, P. M., Jans, J. J. M. y Verhoeven-Duif, N. M. (2019b): "Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 2: Treatment strategies", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol. 42, n° 5, pp. 745-761.

Halim, N. D., Mcfate, T., Mohyeldin, A., Okagaki, P., Korotchkina, L. G., Patel, M. S., Jeoung, N. H., Harris, R. A., Schell, M. J. y Verma, A. (2010): "Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons", *Glia*, Vol. 58, n° 10, pp. 1168-1176.

Han, L., Shen, W. J., Bittner, S., Kraemer, F. B. y Azhar, S. (2017): "PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR-beta/delta and PPAR-gamma", *Future cardiology*, Vol. 13, n° 3, pp. 279-296.

Hannah, W. B., Dempsey, K. J., Schillaci, L. P., Zacharias, M., McCandless, S. E., Wynshaw-Boris, A., Konczal, L. L. y Bedoyan, J. K. (2019): "Life-threatening

presentations of propionic acidemia due to the Amish PCCB founder variant", *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, Vol. 21, pp. 100537-100540.

Haridhasapavalan, K. K., Borgohain, M. P., Dey, C., Saha, B., Narayan, G., Kumar, S. y Thummer, R. P. (2019): "An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells", *Gene*, Vol. 686, pp. 146-159.

Hartung, T. (2008): "Thoughts on limitations of animal models", *Parkinsonism and Related Disorders*, Vol. 14, pp. 81-84.

Heidari, R. (2019): "Brain mitochondria as potential therapeutic targets for managing hepatic encephalopathy", *Life Sciences*, Vol. 218, pp. 65-80.

Henstridge, C. M., Sideris, D. I., Carroll, E., Rotariu, S., Salomonsson, S., Tzioras, M., McKenzie, C. A., Smith, C., von Arnim, C. A. F., Ludolph, A. C., Lule, D., Leighton, D., Warner, J., Cleary, E., Newton, J., Swingler, R., Chandran, S., Gillingwater, T. H., Abrahams, S. y Spires-Jones, T. L. (2018): "Synapse loss in the prefrontal cortex is associated with cognitive decline in amyotrophic lateral sclerosis", *Acta Neuropathologica*, Vol. 135, n° 2, pp. 213-226.

Herzig, S. y Shaw, R. J. (2018): "AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 19, n° 2, pp. 121-135.

Hetz, C., Chevet, E. y Oakes, S. A. (2015): "Proteostasis control by the unfolded protein response", *Nature Cell Biology*, Vol. 17, n° 7, pp. 829-838.

Hu, S. Y., Zhuang, Q. Q., Qiu, Y., Zhu, X. F. y Yan, Q. F. (2019): "Cell models and drug discovery for mitochondrial diseases", *Journal of Zhejiang University Science*, Vol. 20, n° 5, pp. 449-456.

Huang, S. T., Hsu, W. F., Huang, H. S., Yen, J. H., Lin, M. C., Peng, C. Y. y Yen, H. R. (2019): "Improved Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients with Cardiac Arrhythmia by Amiodarone Treatment through Autophagy", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20, n° 16, pp. 3978-3997.

**I**mperlini, E., Santorelli, L., Orru, S., Scolamiero, E., Ruoppolo, M. y Caterino, M. (2016): "Mass Spectrometry-Based Metabolomic and Proteomic Strategies in Organic Acidemias", *BioMed Research International*, Vol. 2016, pp. 9210408.

**J**avadov, S., Jang, S. y Agostini, B. (2014): "Crosstalk between mitogen-activated protein kinases and mitochondria in cardiac diseases: therapeutic perspectives", *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 144, n° 2, pp. 202-225.

Jha, M. K. y Morrison, B. M. (2018): "Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: New insights into the role of nervous system metabolic transporters", *Experimental Neurology*, Vol. 309, pp. 23-31.

Jurecki, E., Ueda, K., Frazier, D., Rohr, F., Thompson, A., Husa, C., Obernolte, L., Reineking, B., Roberts, A. M., Yannicelli, S., Osara, Y., Stembridge, A., Splett, P. y Singh, R. H. (2019): "Nutrition management guideline for propionic acidemia: An evidence- and consensus-based approach", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 126, n° 4, pp. 341-354.

Juzwik, C. A., S Drake, S., Zhang, Y., Paradis-Isler, N., Sylvester, A., Amar-Zifkin, A., Douglas, C., Morquette, B., Moore, C. S. y Fournier, A. E. (2019): "microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review", *Progress in Neurobiology*, Vol. 182, pp. 101664-10676.

**K**alman, S., Garbett, K. A., Janka, Z. y Mirnics, K. (2016): "Human dermal fibroblasts in psychiatry research", *Neuroscience*, Vol. 320, pp. 105-121.

Kambis, T. N., Shahshahan, H. R., Kar, S., Yadav, S. K. y Mishra, P. K. (2019): "Transgenic Expression of miR-133a in the Diabetic Akita Heart Prevents Cardiac Remodeling and Cardiomyopathy", *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, Vol. 6, pp. 45-56.

Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J. K., Todani, M., Nakagawa, M., Osawa, M., Yashiro, Y., Yamanaka, S. y Osafune, K. (2019): "Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development", *Physiological Reviews*, Vol. 99, n° 1, pp. 79-114.

Kayama, T., Suzuki, I., Odawara, A., Sasaki, T. y Ikegaya, Y. (2018): "Temporally coordinated spiking activity of human induced pluripotent stem cell-derived neurons co-cultured with astrocytes", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 495, n° 1, pp. 1028-1033.

Kelson, T. L., Ohura, T. y Kraus, J. P. (1996): "Chaperonin-mediated assembly of wild-type and mutant subunits of human propionyl-CoA carboxylase expressed in *Escherichia coli*", *Human Molecular Genetics*, Vol. 5, n° 3, pp. 331-337.

Khuchua, Z., Glukhov, A. I., Strauss, A. W. y Javadov, S. (2018): "Elucidating the Beneficial Role of PPAR Agonists in Cardiac Diseases", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19, n° 11, pp. 3464-3481.

Kim, E. K. y Choi, E. J. (2015): "Compromised MAPK signalling in human diseases: an update", *Archives of Toxicology*, Vol. 89, n° 6, pp. 867-882.

Kovacevic, A., Garbade, S. F., Hoffmann, G. F., Gorenflo, M., Kolker, S. y Staufner, C. (2020): "Cardiac phenotype in propionic acidemia - Results of an observational monocentric study", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 130, n°1, pp. 41-48.

**L**arosa, V. y Remacle, C. (2018): "Insights into the respiratory chain and oxidative stress", *Bioscience Reports*, Vol. 38, n° 5, pp. 38-52.

Lei, X. G., Zhu, J. H., Cheng, W. H., Bao, Y., Ho, Y. S., Reddi, A. R., Holmgren, A. y Arner, E. S. (2016): "Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications", *Physiological Reviews*, Vol. 96, n° 1, pp. 307-364.

Li, J., Zhang, D., Brundel, B. J. J. M. y Wiersma, M. (2019): "Imbalance of ER and Mitochondria Interactions: Prelude to Cardiac Ageing and Disease?", *Cells*, Vol. 8, n° 12, pp. 1617-1632.

Li, L., Chao, J. y Shi, Y. (2018): "Modelling neurological diseases using iPSC-derived neural cells: iPSC modelling of neurological diseases", *Cell and Tissue Research*, Vol. 371, n° 1, pp. 143-151.

Li, P. A., Hou, X. y Hao, S. (2017): "Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration", *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 95, pp. 2025-2029.

Li, Y., Jiang, J., Liu, W., Wang, H., Zhao, L., Liu, S., Li, P., Zhang, S., Sun, C., Wu, Y., Yu, S., Li, X., Zhang, H., Qian, H., Zhang, D., Guo, F., Zhai, Q., Ding, Q., Wang, L. y Ying, H. (2018): "microRNA-378 promotes autophagy and inhibits apoptosis in skeletal muscle", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 115, n° 46, pp. E10849-E10858.

Li, Z., Song, Y., Liu, L., Hou, N., An, X., Zhan, D., Li, Y., Zhou, L., Li, P., Yu, L., Xia, J., Zhang, Y., Wang, J. y Yang, X. (2017): "miR-199a impairs autophagy and induces cardiac hypertrophy through mTOR activation", *Cell Death and Differentiation*, Vol. 24, n° 7, pp. 1205-1213.

Lian, X., Zhang, J., Azarin, S. M., Zhu, K., Hazeltine, L. B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T. J. y Palecek, S. P. (2013): "Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signalling under fully defined conditions", *Nature Protocols*, Vol. 8, n° 1, pp. 162-175.

Liu, J., Wang, P., Luo, J., Huang, Y., He, L., Yang, H., Li, Q., Wu, S., Zhelyabovska, O. y Yang, Q. (2011): "Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation in adult hearts facilitates mitochondrial function and cardiac performance under pressure-overload condition", *Hypertension*, Vol. 57, n° 2, pp. 223-230.

Longo, N., Price, L. B., Gappmaier, E., Cantor, N. L., Ernst, S. L., Bailey, C. y Pasquali, M. (2017): "Anaplerotic therapy in propionic acidemia", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 122, n° 1-2, pp. 51-59.

Luo, S., Chen, Y., He, R., Shi, Y. y Su, L. (2018): "Rescuing infusion of miRNA-1 prevents cardiac remodelling in a heart-selective miRNA deficient mouse", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 495, n° 1, pp. 607-613.

**M**a, L. L., Ma, X., Kong, F. J., Guo, J. J., Shi, H. T., Zhu, J. B., Zou, Y. Z. y Ge, J. B. (2018): "Mammalian target of rapamycin inhibition attenuates myocardial ischaemia-reperfusion injury in hypertrophic heart", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol. 22, n° 3, pp. 1708-1719.

- Ma, X., Xie, Y., Chen, Y., Han, B., Li, J. y Qi, S. (2016): "Post-ischemia mdivi-1 treatment protects against ischemia/reperfusion-induced brain injury in a rat model", *Neuroscience Letters*, Vol. 632, pp. 23-32.
- Machiraju, P. y Greenway, S. C. (2019): "Current methods for the maturation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes", *World Journal of Stem Cells*, Vol. 11, n° 1, pp. 33-43.
- Madrigal-Matute, J. y Cuervo, A. M. (2016): "Regulation of Liver Metabolism by Autophagy", *Gastroenterology*, Vol. 150, n° 2, pp. 328-339.
- Magistretti, P. J. y Allaman, I. (2015): "A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging", *Neuron*, Vol. 86, n° 4, pp. 883-901.
- Mandrioli, J., D'Amico, R., Zucchi, E., Gessani, A., Fini, N., Fasano, A., Caponnetto, C., Chio, A., Dalla Bella, E., Lunetta, C., Mazzini, L., Marinou, K., Soraru, G., de Biasi, S., Lo Tartaro, D., Pinti, M., Cossarizza, A. y RAP-ALS investigators group (2018): "Rapamycin treatment for amyotrophic lateral sclerosis: Protocol for a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, clinical trial (RAP-ALS trial)", *Medicine*, Vol. 97, n° 24, pp. 24-34.
- Mardach, R., Verity, M. A. y Cederbaum, S. D. (2005): "Clinical, pathological, and biochemical studies in a patient with propionic acidemia and fatal cardiomyopathy", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 85, n° 4, pp. 286-290.
- Marti, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carrio, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C. R. y Izpisua Belmonte, J. C. (2013): "Characterization of pluripotent stem cells", *Nature Protocols*, Vol. 8, n° 2, pp. 223-253.
- Martinez-Reyes, I. y Chandel, N. S. (2020): "Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease", *Nature Communications*, Vol. 11, pp. 102-113.
- Mc Guire, P. J., Parikh, A. y Diaz, G. A. (2009): "Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 98, n° 1-2, pp. 173-180.
- McMullen, J. R., Sherwood, M. C., Tarnavski, O., Zhang, L., Dorfman, A. L., Shioi, T. y Izumo, S. (2004): "Inhibition of mTOR signalling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload", *Circulation*, Vol. 109, n° 24, pp. 3050-3055.
- Meng, L. H. y Zheng, X. F. (2015): "Toward rapamycin analog (rapalog)-based precision cancer therapy", *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 36, n° 10, pp. 1163-1169.
- Mertens, J., Reid, D., Lau, S., Kim, Y. y Gage, F. H. (2018): "Aging in a Dish: iPSC-Derived and Directly Induced Neurons for Studying Brain Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases", *Annual Review of Genetics*, Vol. 52, pp. 271-293.
- Mialet-Perez, J. y Vindis, C. (2017): "Autophagy in health and disease: focus on the cardiovascular system", *Essays in Biochemistry*, Vol. 61, n° 6, pp. 721-732.
- Miyazaki, T., Ohura, T., Kobayashi, M., Shigematsu, Y., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Hata, I., Aoki, Y., Yang, X., Minjares, C., Haruta, I., Uto, H., Ito, Y. y Muller, U. (2001): "Fatal propionic acidemia in mice lacking propionyl-CoA carboxylase and its rescue by postnatal, liver-specific supplementation via a transgene", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, n° 38, pp. 35995-35999.

Moloney, J. N. y Cotter, T. G. (2018): "ROS signalling in the biology of cancer", *Seminars in Cell and Developmental Biology*, Vol. 80, pp. 50-64.

Morato, L., Ruiz, M., Boada, J., Calingasan, N. Y., Galino, J., Guilera, C., Jove, M., Naudi, A., Ferrer, I., Pamplona, R., Serrano, M., Portero-Otin, M., Beal, M. F., Fourcade, S. y Pujol, A. (2015): "Activation of sirtuin 1 as therapy for the peroxisomal disease adrenoleukodystrophy", *Cell Death and Differentiation*, Vol. 22, n° 11, pp. 1742-1753.

Morland, C., Froland, A. S., Pettersen, M. N., Storm-Mathisen, J., Gundersen, V., Rise, F. y Hassel, B. (2018): "Propionate enters GABAergic neurons, inhibits GABA transaminase, causes GABA accumulation and lethargy in a model of propionic acidemia", *Biochemical Journal*, Vol. 475, n° 4, pp. 749-758.

Morris, G., Walker, A. J., Berk, M., Maes, M. y Puri, B. K. (2018): "Cell Death Pathways: a Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists", *Molecular Neurobiology*, Vol. 55, n° 7, pp. 5767-5786.

Movahed, A., Yu, L., Thandapilly, S. J., Louis, X. L. y Netticadan, T. (2012): "Resveratrol protects adult cardiomyocytes against oxidative stress mediated cell injury", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 527, n° 2, pp. 74-80.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986): "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction", *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 51, n°1, pp. 263-273.

**N**akai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., Nishida, K., Hori, M., Mizushima, N. y Otsu,

K. (2007): "The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress", *Nature Medicine*, Vol. 13, n° 5, pp. 619-624.

Nakamura, M. y Sadoshima, J. (2018): "Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy", *Nature Reviews Cardiology*, Vol. 15, n° 7, pp. 387-407.

Nascimbeni, A. C., Fanin, M., Angelini, C. y Sandri, M. (2017): "Autophagy dysregulation in Danon disease", *Cell Death and Disease*, Vol. 8, n° 1, pp. e2565.

Nguyen, N. H., Morland, C., Gonzalez, S. V., Rise, F., Storm-Mathisen, J., Gundersen, V. y Hassel, B. (2007): "Propionate increases neuronal histone acetylation, but is metabolized oxidatively by glia. Relevance for propionic acidemia", *Journal of Neurochemistry*, Vol. 101, n° 3, pp. 806-814.

Nissanka, N. y Moraes, C. T. (2018): "Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease", *FEBS letters*, Vol. 592, n° 5, pp. 728-742.

**O**dawara, A., Saitoh, Y., Alhebshi, A. H., Gotoh, M. y Suzuki, I. (2014): "Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 443, n° 4, pp. 1176-1181.

Olsen, R. K., Cornelius, N. y Gregersen, N. (2015): "Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol. 38, n° 4, pp. 703-719.

Osellame, L. D., Blacker, T. S. y Duchon, M. R. (2012): "Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function", *Best*

Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol 26, pp. 711-723.

Oyarzabal, A. y Marin-Valencia, I. (2019): "Synaptic energy metabolism and neuronal excitability, in sickness and health", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol. 42, nº 2, pp. 220-236.

**P**alikaras, K. y Tavernarakis, N. (2014): "Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis", *Experimental Gerontology*, Vol. 56, pp. 182-188.

Palomer, X., Barroso, E., Zarei, M., Botteri, G. y Vazquez-Carrera, M. (2016): "PPARbeta/delta and lipid metabolism in the heart", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1861, nº 10, pp. 1569-1578.

Parikh, S. S., Blackwell, D. J., Gomez-Hurtado, N., Frisk, M., Wang, L., Kim, K., Dahl, C. P., Fiane, A., Tonnessen, T., Kryshnal, D. O., Louch, W. E. y Knollmann, B. C. (2017): "Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes", *Circulation Research*, Vol. 121, nº 12, pp. 1323-1330.

Pena, L., Franks, J., Chapman, K. A., Gropman, A., Ah Mew, N., Chakrapani, A., Island, E., MacLeod, E., Matern, D., Smith, B., Stagni, K., Sutton, V. R., Ueda, K., Urv, T., Venditti, C., Enns, G. M. y Summar, M. L. (2012): "Natural history of propionic acidemia", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 105, nº 1, pp. 5-9.

Pentimalli, F., Grelli, S., Di Daniele, N., Melino, G. y Amelio, I. (2019): "Cell death pathologies: targeting death pathways and the immune system for cancer therapy", *Genes and Immunity*, Vol. 20, nº 7, pp. 539-554.

Peoples, J. N., Saraf, A., Ghazal, N., Pham, T. T. y Kwong, J. Q. (2019): "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease", *Experimental and Molecular Medicine*, Vol. 51, nº 12, pp. 1-13.

Perlman, R. L. (2016): "Mouse models of human disease: An evolutionary perspective", *Evolution, Medicine, and Public Health*, Vol. 2016, nº 1, pp. 170-176.

Pettenuzzo, L. F., Schuck, P. F., Fontella, F., Wannmacher, C. M., Wyse, A. T., Dutra-Filho, C. S., Netto, C. A. y Wajner, M. (2002): "Ascorbic acid prevents cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze", *Pharmacology, Biochemistry, and Behaviour*, Vol. 73, nº 3, pp. 623-629.

Piazzini, M., Bavelloni, A., Gallo, A., Faenza, I. y Blalock, W. L. (2019): "Signal Transduction in Ribosome Biogenesis: A Recipe to Avoid Disaster", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20, nº 11, pp. 2718-2765.

Pickett, E. K., Rose, J., McCrory, C., McKenzie, C. A., King, D., Smith, C., Gillingwater, T. H., Henstridge, C. M. y Spires-Jones, T. L. (2018): "Region-specific depletion of synaptic mitochondria in the brains of patients with Alzheimer's disease", *Acta Neuropathologica*, Vol. 136, nº 5, pp. 747-757.

Pickles, S., Vigie, P. y Youle, R. J. (2018): "Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance", *Current Biology*, Vol. 28, nº 4, pp. 170-185.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. y Bitto, A. (2017): "Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2017, pp. 8416763.

Popov, L. D. (2020): "Mitochondrial biogenesis: An update", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol. 14, n° 9, pp. 4892-4899.

Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J. R., Chung, Y. L. y Schulze, A. (2008): "SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth", *Cell Metabolism*, Vol. 8, n° 3, pp. 224-236.

Porter, G. A., J. y Beutner, G. (2018): "Cyclophilin D, Somehow a Master Regulator of Mitochondrial Function", *Biomolecules*, Vol. 8, n° 4, pp. 176-196.

Prakash, V., Carson, B. B., Feenstra, J. M., Dass, R. A., Sekyrova, P., Hoshino, A., Petersen, J., Guo, Y., Parks, M. M., Kurylo, C. M., Batchelder, J. E., Haller, K., Hashimoto, A., Rundqvist, H., Condeelis, J. S., Allis, C. D., Drygin, D., Nieto, M. A., Andang, M., Percipalle, P., Bergh, J., Adameyko, I., Farrants, A. O., Hartman, J., Lyden, D., Pietras, K., Blanchard, S. C. y Vincent, C. T. (2019): "Ribosome biogenesis during cell cycle arrest fuels EMT in development and disease", *Nature Communications*, Vol. 10, n° 1, pp. 2110-2126.

**Q**iu, Z., Wei, Y., Song, Q., Du, B., Wang, H., Chu, Y. y Hu, Y. (2019): "The Role of Myocardial Mitochondrial Quality Control in Heart Failure", *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 10, pp. 1404-1412.

Quintanilla, R. A., Tapia, C. y Perez, M. J. (2017): "Possible role of mitochondrial permeability transition pore in the pathogenesis of Huntington disease", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 483, n° 4, pp. 1078-1083.

**R**aefsky, S. M. y Mattson, M. P. (2017): "Adaptive responses of neuronal

mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 102, pp. 203-216.

Raut, S. K., Singh, G. B., Rastogi, B., Saikia, U. N., Mittal, A., Dogra, N., Singh, S., Prasad, R. y Khullar, M. (2016): "miR-30c and miR-181a synergistically modulate p53-p21 pathway in diabetes induced cardiac hypertrophy", *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 417, n° 1-2, pp. 191-203.

Ribas, G. S., Biancini, G. B., Mescka, C., Wayhs, C. Y., Sitta, A., Wajner, M. y Vargas, C. R. (2012): "Oxidative stress parameters in urine from patients with disorders of propionate metabolism: a beneficial effect of L-carnitine supplementation", *Cellular and Molecular Neurobiology*, Vol. 32, n° 1, pp. 77-82.

Richard, E., Gallego-Villar, L., Rivera-Barahona, A., Oyarzabal, A., Perez, B., Rodriguez-Pombo, P. y Desviat, L. R. (2018): "Altered Redox Homeostasis in Branched-Chain Amino Acid Disorders, Organic Acidurias, and Homocystinuria", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2018, pp. 1246069.

Rigo, F. K., Pasquetti, L., Malfatti, C. R., Figuera, M. R., Coelho, R. C., Petri, C. Z. y Mello, C. F. (2006): "Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats", *Neuroscience Letters*, Vol. 408, n° 2, pp. 151-154.

Rincon, A., Aguado, C., Desviat, L. R., Sanchez-Alcudia, R., Ugarte, M. y Perez, B. (2007): "Propionic and methylmalonic acidemia: antisense therapeutics for intronic variations causing aberrantly spliced messenger RNA", *American Journal of Human Genetics*, Vol. 81, n° 6, pp. 1262-1270.

Rivera-Barahona, A., Alonso-Barroso, E., Perez, B., Murphy, M. P., Richard, E. y

- Desviat, L. R. (2017a): "Treatment with antioxidants ameliorates oxidative damage in a mouse model of propionic acidemia", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 122, n° 1-2, pp. 43-50.
- Rivera-Barahona, A., Fulgencio-Covian, A., Perez-Cerda, C., Ramos, R., Barry, M. A., Ugarte, M., Perez, B., Richard, E. y Desviat, L. R. (2017b): "Dysregulated miRNAs and their pathogenic implications for the neurometabolic disease propionic acidemia", *Scientific Reports*, Vol. 7, n° 1, pp. 5727-5735.
- Rivera-Barahona, A., Perez, B., Richard, E. y Desviat, L. R. (2017c): "Role of miRNAs in human disease and inborn errors of metabolism", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol. 40, n° 4, pp. 471-480.
- Robertson, C. L., Scafidi, S., McKenna, M. C. y Fiskum, G. (2009): "Mitochondrial mechanisms of cell death and neuroprotection in pediatric ischemic and traumatic brain injury", *Experimental Neurology*, Vol. 218, n° 2, pp. 371-380.
- Rodriguez-Arribas, M., Yakhine-Diop, S. M. S., Pedro, J. M. B., Gomez-Suaga, P., Gomez-Sanchez, R., Martinez-Chacon, G., Fuentes, J. M., Gonzalez-Polo, R. A. y Niso-Santano, M. (2017): "Mitochondria-Associated Membranes (MAMs): Overview and Its Role in Parkinson's Disease", *Molecular Neurobiology*, Vol. 54, n° 8, pp. 6287-6303.
- Roskoski, R. (2019): "Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors", *Pharmacological Research*, Vol. 144, pp. 19-50.
- Rossi, A., Pizzo, P. y Filadi, R. (2019): "Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics", *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, Vol. 1866, n° 7, pp. 1068-1078.
- Rottenberg, H. y Hoek, J. B. (2017): "The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore", *Aging Cell*, Vol. 16, n° 5, pp. 943-955.
- Rowe, R. G. y Daley, G. Q. (2019): "Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery", *Nature Reviews Genetics*, Vol. 20, n° 7, pp. 377-388.
- Rupaimoole, R. y Slack, F. J. (2017): "MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases", *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 16, n° 3, pp. 203-222.
- Rydell-Tormanen, K. y Johnson, J. R. (2019): "The Applicability of Mouse Models to the Study of Human Disease", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1940, pp. 3-22.
- Ryter, S. W., Koo, J. K. y Choi, A. M. (2014): "Molecular regulation of autophagy and its implications for metabolic diseases", *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, Vol. 17, n° 4, pp. 329-337.
- Sabbah, H. N. (2020): "Targeting the Mitochondria in Heart Failure: A Translational Perspective", *Journal of the American College of Cardiology Basic to Translational Science*, Vol. 5, n° 1, pp. 88-106.
- Saha, S., Panigrahi, D. P., Patil, S. y Bhutia, S. K. (2018): "Autophagy in health and disease: A comprehensive review", *Biomedicine and Pharmacotherapy = Biomedecine and Pharmacotherapie*, Vol. 104, pp. 485-495.
- Saito, A. y Imaizumi, K. (2018): "Unfolded Protein Response-Dependent Communication and Contact among Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Plasma Membrane", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19, n° 10, pp. 3215-3232.



Sampath, H. y Lloyd, R. S. (2019): "Roles of OGG1 in transcriptional regulation and maintenance of metabolic homeostasis", *DNA Repair*, Vol. 81, pp. 102667-102676.

Sanchez-Alcudia, R., Perez, B., Perez-Cerda, C., Ugarte, M. y Desviat, L. R. (2011): "Overexpression of adapted U1snRNA in patients' cells to correct a 5' splice site mutation in propionic acidemia", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 102, n° 2, pp. 134-138.

Sanchez-Alcudia, R., Perez, B., Ugarte, M. y Desviat, L. R. (2012): "Feasibility of nonsense mutation readthrough as a novel therapeutical approach in propionic acidemia", *Human Mutation*, Vol. 33, n° 6, pp. 973-980.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977): "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 74, n° 12, pp. 5463-5467.

Scaini, G., Teodorak, B. P., Jeremias, I. C., Morais, M. O., Mina, F., Dominghini, D., Pescador, B., Comim, C. M., Schuck, P. F., Ferreira, G. C., Quevedo, J. y Streck, E. L. (2012): "Antioxidant administration prevents memory impairment in an animal model of maple syrup urine disease", *Behavioural Brain Research*, Vol. 231, n° 1, pp. 92-96.

Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. (2008): "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method", *Nature Protocols*, Vol. 3, n° 6, pp. 1101-1108.

Schuler, A. M., Gower, B. A., Matern, D., Rinaldo, P. y Wood, P. A. (2004): "Influence of dietary fatty acid chain-length on metabolic tolerance in mouse models of inherited defects in mitochondrial fatty acid beta-oxidation", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 83, n° 4, pp. 322-329.

Schulze, P. C., Drosatos, K. y Goldberg, I. J. (2016): "Lipid Use and Misuse by the Heart", *Circulation Research*, Vol. 118, n° 11, pp. 1736-1751.

Schwab, M. A., Sauer, S. W., Okun, J. G., Nijtmans, L. G., Rodenburg, R. J., van den Heuvel, L. P., Drose, S., Brandt, U., Hoffmann, G. F., Ter Laak, H., Kolker, S. y Smeitink, J. A. (2006): "Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins", *Biochemical Journal*, Vol. 398, n° 1, pp. 107-112.

Sciarretta, S., Forte, M., Frati, G. y Sadoshima, J. (2018b): "New Insights into the Role of mTOR Signaling in the Cardiovascular System", *Circulation Research*, Vol. 122, n° 3, pp. 489-505.

Sciarretta, S., Maejima, Y., Zablocki, D. y Sadoshima, J. (2018a): "The Role of Autophagy in the Heart", *Annual Review of Physiology*, Vol. 80, pp. 1-26.

Shah, P., Bristow, M. R. y Port, J. D. (2017): "MicroRNAs in Heart Failure, Cardiac Transplantation, and Myocardial Recovery: Biomarkers with Therapeutic Potential", *Current Heart Failure Reports*, Vol. 14, n° 6, pp. 454-464.

Shih, Y. H., Zhang, Y., Ding, Y., Ross, C. A., Li, H., Olson, T. M. y Xu, X. (2015): "Cardiac transcriptome and dilated cardiomyopathy genes in zebrafish", *Circulation Cardiovascular Genetics*, Vol. 8, n° 2, pp. 261-269.

Silva, L. G., Ferguson, B. S., Avila, A. S. y Faciola, A. P. (2018): "Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells", *Journal of Animal Science*, Vol. 96, n° 12, pp. 5244-5252.

- Silva-Palacios, A., Zazueta, C. y Pedraza-Chaverri, J. (2020): "ER membranes associated with mitochondria: Possible therapeutic targets in heart-associated diseases", *Pharmacological Research*, Vol. 156, pp. 104758-104772.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L. y Kukreti, S. (2019): "Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases", *Molecules*, Vol. 24, n° 8, pp. 1583-1603.
- Smith, G. L. y Eisner, D. A. (2019): "Calcium Buffering in the Heart in Health and Disease", *Circulation*, Vol. 139, n° 20, pp. 2358-2371.
- Smolina, N., Bruton, J., Kostareva, A. y Sejersen, T. (2017): "Assaying Mitochondrial Respiration as an Indicator of Cellular Metabolism and Fitness" *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1601, pp.79-87.
- Spinelli, J. B. y Haigis, M. C. (2018): "The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism". *Nature Cell Biology*, Vol. 20, n°7, pp.745-754.
- Stepien, K. M., Heaton, R., Rankin, S., Murphy, A., Bentley, J., Sexton, D. y Hargreaves, I. P. (2017): "Evidence of Oxidative Stress and Secondary Mitochondrial Dysfunction in Metabolic and Non-Metabolic Disorders" *Journal of Clinical Medicine*, Vol. 6, pp. 71-96.
- T**ahara, T., Kraus, J. P. y Rosenberg, L. E. (1990): "An unusual insertion/deletion in the gene encoding the beta-subunit of propionyl-CoA carboxylase is a frequent mutation in Caucasian propionic acidemia", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 87, n° 4, pp. 1372-1376.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006): "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", *Cell*, Vol. 126, n° 4, pp. 663-676.
- Tamargo-Gomez, I. y Marino, G. (2018): "AMPK: Regulation of Metabolic Dynamics in the Context of Autophagy", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19, n° 12, pp. 3812-3828.
- Tamayo, M., Fulgencio-Covian, A., Navarro-Garcia, J. A., Val-Blasco, A., Ruiz-Hurtado, G., Gil-Fernandez, M., Martin-Nunes, L., Lopez, J. A., Desviat, L. R., Delgado, C., Richard, E. y Fernandez-Velasco, M. (2020): "Intracellular calcium mishandling leads to cardiac dysfunction and ventricular arrhythmias in a mouse model of propionic acidemia", *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, Vol. 1866, n° 1, pp. 165586.
- Tavares, M. R., Pavan, I. C., Amaral, C. L., Meneguello, L., Luchessi, A. D. y Simabuco, F. M. (2015): "The S6K protein family in health and disease", *Life Sciences*, Vol. 131, pp. 1-10.
- Tedesco-Silva, H., Del Carmen Rial, M., Cruz Santiago, J., Mazzali, M., Pacheco-Silva, A. y Torres, R. (2019): "Optimizing the clinical utility of sirolimus-based immunosuppression for kidney transplantation", *Clinical Transplantation*, Vol. 33, n° 2, pp. e13464.
- Tejedor, J. R. y Fraga, M. F. (2017): "Interindividual epigenetic variability: Sound or noise?", *BioEssays*, Vol. 39, n° 7, pp. 1700055.
- Tong, M., Saito, T., Zhai, P., Oka, S. I., Mizushima, W., Nakamura, M., Ikeda, S., Shirakabe, A. y Sadoshima, J. (2019): "Mitophagy Is Essential for Maintaining Cardiac Function During High Fat Diet-Induced Diabetic Cardiomyopathy", *Circulation Research*, Vol. 124, n° 9, pp. 1360-1371.

Tubbs, E. y Rieusset, J. (2017): "Metabolic signaling functions of ER-mitochondria contact sites: role in metabolic diseases", *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol. 58, n° 2, pp. 87-106.

Tuncel, A. T., Boy, N., Morath, M. A., Horster, F., Mutze, U. y Kolker, S. (2018): "Organic acidurias in adults: late complications and management", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol. 41, n° 5, pp. 765-776.

Turner, N. A. y Blythe, N. M. (2019): "Cardiac Fibroblast p38 MAPK: A Critical Regulator of Myocardial Remodelling", *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, Vol. 6, n° 3, pp. 27-35.

**U**llrich, M., Assmus, B., Augustin, A. M., Habich, H., Abesser, M., Martin Machado, J., Werner, F., Erkens, R., Arias-Loza, A. P., Umbenhauer, S., Wagner, H., Benz, P. M., Unger, A., Linke, W. A., Frantz, S., Baba, H. A., Kuhn, M. y Schuh, K. (2019): "SPRED2 deficiency elicits cardiac arrhythmias and premature death via impaired autophagy", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 129, pp. 13-26.

Ulmer, B. M. y Eschenhagen, T. (2020): "Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for studying energy metabolism", *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, Vol. 1867, n° 3, pp. 118471.

**V**akifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T. y Norberg, E. (2017): "The role of mitochondria in metabolism and cell death", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 482, n° 3, pp. 426-431.

Van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B. A., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Kelm, R. J. y Olson, E. N. (2009): "A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle

performance", *Developmental Cell*, Vol. 17, n° 5, pp. 662-673.

Vienberg, S., Geiger, J., Madsen, S. y Dalgaard, L. T. (2017): "MicroRNAs in metabolism", *Acta Physiologica*, Vol. 219, n° 2, pp. 346-361.

Villena, J. A. (2015): "New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond", *FEBS Journal*, Vol. 282, pp. 647-672.

**W**ajner, M. (2019): "Neurological manifestations of organic acidurias", *Nature Reviews Neurology*, Vol. 15, n° 5, pp. 253-271.

Wajner, M. y Goodman, S. I. (2011): "Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol. 42, pp. 31-38.

Wang, P., Liu, J., Li, Y., Wu, S., Luo, J., Yang, H., Subbiah, R., Chatham, J., Zhelyabovska, O. y Yang, Q. (2010): "Peroxisome proliferator-activated receptor delta is an essential transcriptional regulator for mitochondrial protection and biogenesis in adult heart", *Circulation Research*, Vol. 106, n° 5, pp. 911-919.

Wang, Q., Ye, B., Wang, P., Yao, F., Zhang, C. y Yu, G. (2019): "Overview of microRNA-199a Regulation in Cancer", *Cancer Management and Research*, Vol. 11, pp. 10327-10335.

Wang, X., Tao, Y., Huang, Y., Zhan, K., Xue, M., Wang, Y., Ruan, D., Liang, Y., Huang, X., Lin, J., Chen, Z., Lv, L., Li, S., Chen, G., Wang, Y., Chen, R., Cong, W. y Jin, L. (2017): "Catalase ameliorates diabetes-induced cardiac injury through reduced p65/RelA-mediated transcription of BECN1",

Journal of Cellular and Molecular Medicine, Vol. 21, n° 12, pp. 3420-3434.

Wang, Y., Zhang, Q., Wei, C., Zhao, L., Guo, X., Cui, X., Shao, L., Long, J., Gu, J. y Zhao, M. (2018): "MiR-378 modulates energy imbalance and apoptosis of mitochondria induced by doxorubicin", American Journal of Translational Research, Vol. 10, n° 11, pp. 3600-3609.

Wangler, M. F., Yamamoto, S., Chao, H. T., Posey, J. E., Westerfield, M., Postlethwait, J., Members of the Undiagnosed Diseases Network, (UDN), Hieter, P., Boycott, K. M., Campeau, P. M. y Bellen, H. J. (2017): "Model Organisms Facilitate Rare Disease Diagnosis and Therapeutic Research", Genetics, Vol. 207, n° 1, pp. 9-27.

Wehr, N. B. y Levine, R. L. (2013): "Quantification of protein carbonylation", Methods of Molecular Biology, Vol. 965, pp. 265-281.

Wendler, A. y Wehling, M. (2010): "The translatability of animal models for clinical development: biomarkers and disease models", Current Opinion in Pharmacology, Vol. 10, n° 5, pp. 601-606.

Wessels, A. y Sedmera, D. (2003): "Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man", Physiological Genomics, Vol. 15, n° 3, pp. 165-176.

Wiegand, C. y Banerjee, I. (2019): "Recent advances in the applications of iPSC technology", Current Opinion in Biotechnology, Vol. 60, pp. 250-258.

Wilson, D. F. (2017): "Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism" Journal of Physiology, Vol. 595, n° 23, pp.7023-7038.

Winqvist, R. J. y Gribkoff, V. K. (2020): "Targeting putative components of the mitochondrial permeability transition pore for

novel therapeutics", Biochemical Pharmacology, Vol. 177, pp. 113995.

Winterbourn, C. C. (1995): "Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction", Toxicology Letters, Vol. 82-83, pp. 969-974.

Wojciechowska, A., Braniewska, A. y Kozar-Kaminska, K. (2017): "MicroRNA in cardiovascular biology and disease", Advances in Clinical and Experimental Medicine, Vol. 26, n° 5, pp. 865-874.

Wongkittichote, P., Ah Mew, N. y Chapman, K. A. (2017): " Propionyl-CoA carboxylase - A review", Molecular Genetics and Metabolism, Vol. 122, n° 4, pp. 145-152.

Wu, S., Lu, Q., Ding, Y., Wu, Y., Qiu, Y., Wang, P., Mao, X., Huang, K., Xie, Z. y Zou, M. H. (2019): "Hyperglycemia-Driven Inhibition of AMP-Activated Protein Kinase alpha2 Induces Diabetic Cardiomyopathy by Promoting Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Vivo", Circulation, Vol. 139, n° 16, pp. 1913-1936.

Wu, X. y Rapoport, T. A. (2018): "Mechanistic insights into ER-associated protein degradation", Current Opinion in Cell Biology, Vol. 53, pp. 22-28.

Wu, Y. Y., Chiu, F. L., Yeh, C. S. y Kuo, H. C. (2019): "Opportunities and challenges for the use of induced pluripotent stem cells in modelling neurodegenerative disease", Open Biology, Vol. 9, n° 1, pp. 180177.

**X**u, L. y Brink, M. (2016): "mTOR, cardiomyocytes and inflammation in cardiac hypertrophy", Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1863, n° 7, pp. 1894-1903.

Xu ,T., Ding, W., Ji, X., Ao, X., Liu, Y., Yu, W. y Wang, J. (2019): "Oxidative Stress in Cell Death and Cardiovascular Diseases", Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Vol. 2019, pp. 9030563.

**Y**amaguchi, O. (2019): "Autophagy in the Heart", *Circulation Journal*, Vol. 83, nº 4, pp. 697-704.

Yan, Z., Kronemberger, A., Blomme, J., Call, J. A., Caster, H. M., Pereira, R. O., Zhao, H., de Melo, V. U., Laker, R. C., Zhang, M. y Lira, V. A. (2017): "Exercise leads to unfavourable cardiac remodelling and enhanced metabolic homeostasis in obese mice with cardiac and skeletal muscle autophagy deficiency", *Scientific Reports*, Vol. 7, nº 1, pp. 7894-7896.

Yang, N., Chanda, S., Marro, S., Ng, Y. H., Janas, J. A., Haag, D., Ang, C. E., Tang, Y., Flores, Q., Mall, M., Wapinski, O., Li, M., Ahlenius, H., Rubenstein, J. L., Chang, H. Y., Buylla, A. A., Sudhof, T. C. y Wernig, M. (2017): "Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming", *Nature Methods*, Vol. 14, nº 6, pp. 621-628.

Yang, W., Guo, Q., Li, J., Wang, X., Pan, B., Wang, Y., Wu, L., Yan, J. y Cheng, Z. (2019): "microRNA-124 attenuates isoflurane-induced neurological deficits in neonatal rats via binding to EGR1", *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 234, nº 12, pp. 23017-23032.

Yano, S., Li, L., Le, T. P., Moseley, K., Guedalia, A., Lee, J., Gonzalez, I. y Boles, R. G. (2003): "Infantile mitochondrial DNA depletion syndrome associated with methylmalonic aciduria and 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase deficiencies in two unrelated patients: a new phenotype of mtDNA depletion syndrome", *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Vol. 26, nº 5, pp. 481-488.

Yap, S., Vara, R. y Morais, A. (2020): "Post-transplantation Outcomes in Patients with PA or MMA: A Review of the Literature", *Advances in Therapy*, Vol. 8, pp. 1-31.

Yoo, Y. J., Kim, H., Park, S. R. y Yoon, Y. J. (2017): "An overview of rapamycin: from discovery to future perspectives", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 44, nº 4-5, pp. 537-553.

Yoshida, Y. y Yamanaka, S. (2017): "Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later: For Cardiac Applications", *Circulation Research*, Vol. 120, nº 12, pp. 1958-1968.

Yu, S. B. y Pekkurnaz, G. (2018): "Mechanisms Orchestrating Mitochondrial Dynamics for Energy Homeostasis", *Journal of Molecular Biology*, Vol. 430, nº 21, pp. 3922-3941.

**Z**hai, S., Tanimura, A., Graves, S. M., Shen, W. y Surmeier, D. J. (2018): "Striatal synapses, circuits, and Parkinson's disease", *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 48, pp. 9-16.

Zhang, C., Liu, A., Su, G. y Chen, Y. (2019): "Effect of rapamycin on the level of autophagy in rats with early heart failure", *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 120, nº 3, pp. 4065-4070.

Zhao, S., Xia, Y., Zhang, F., Xiong, Z., Li, Y., Yan, W., Chen, X., Wang, W., Wang, H., Gao, E., Lee, Y., Li, C., Wang, S., Zhang, L. y Tao, L. (2017): "Nucleostemin dysregulation contributes to ischemic vulnerability of diabetic hearts: Role of ribosomal biogenesis", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 108, pp. 106-113.

Zheng, Z. y Zhao, B. (2018): "Astragalus polysaccharide protects hypoxia-induced injury by up-regulation of miR-138 in rat neural stem cells", *Biomedicine and Pharmacotherapy = Biomedecine and Pharmacotherapie*, Vol. 102, pp. 295-301.

Zhou, S. S., Jin, J. P., Wang, J. Q., Zhang, Z. G., Freedman, J. H., Zheng, Y. y Cai, L.

(2018): "miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges", *Acta Pharmacologica Sinica*, Vol. 39, n° 7, pp. 1073-1084.

Zinnanti, W. J., Lazovic, J., Wolpert, E. B., Antonetti, D. A., Smith, M. B., Connor, J. R., Woontner, M., Goodman, S. I. y Cheng, K. C. (2006): "A diet-induced mouse model for glutaric aciduria type I", *Brain: a journal of neurology*, Vol. 129, n°4, pp. 899-910.

Zuckermann, A., Osorio-Jaramillo, E. y Aliabadi-Zuckermann, A. Z. (2018): "mTOR Inhibition and Clinical Transplantation: Heart", *Transplantation*, Vol. 102, n° 2, pp. 27-29.

# PUBLICACIONES



Parte de este trabajo ha sido recogido en las siguientes publicaciones:

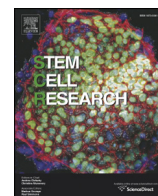
**Alonso-Barroso, E.**, Brasil, S., Briso-Montiano, A., Navarrete, R., Perez-Cerda, C., Ugarte, M., Perez, B., Desviat, L. R. y Richard, E. (2017): "Generation and characterization of a human iPSC line from a patient with propionic acidemia due to defects in the PCCA gene", *Stem Cell Research*, Vol. 23, pp. 173-177.

Rivera-Barahona, A., **Alonso-Barroso, E.**, Perez, B., Murphy, M. P., Richard, E. y Desviat, L. R. (2017): "Treatment with antioxidants ameliorates oxidative damage in a mouse model of propionic acidemia", *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 122, nº 1-2, pp. 43-50.

Lopez-Marquez, A., **Alonso-Barroso, E.**, Cerro-Tello, G., Bravo-Alonso, I., Arribas-Carreira, L., Briso-Montiano, A., Navarrete, R., Perez-Cerda, C., Ugarte, M., Perez, B., Desviat, L. R. y Richard, E. (2019): "Generation and characterization of a human iPSC line (UAMi004-A) from a patient with propionic acidemia due to defects in the PCCB gene", *Stem Cell Research*, Vol. 38, pp. 101469.

Fulgencio-Covian, A., **Alonso-Barroso, E.**, Guenzel, A. J., Rivera-Barahona, A., Ugarte, M., Perez, B., Barry, M. A., Perez-Cerda, C., Richard, E. y Desviat, L. R. (2020): "Pathogenic implications of dysregulated miRNAs in propionic acidemia related cardiomyopathy", *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol. 218, pp. 43-56.





Lab Resource: Stem Cell Line

## Generation and characterization of a human iPSC line from a patient with propionic acidemia due to defects in the *PCCA* gene



Esmeralda Alonso-Barroso<sup>a,b,c,d</sup>, Sandra Brasil<sup>a,b,c,d</sup>, Álvaro Briso-Montiano<sup>a,b,c,d</sup>, Rosa Navarrete<sup>b,c,d</sup>, Celia Pérez-Cerdá<sup>b,c,d</sup>, Magdalena Ugarte<sup>b,c,d</sup>, Belén Pérez<sup>a,b,c,d</sup>, Lourdes R. Desviat<sup>a,b,c,d</sup>, Eva Richard<sup>a,b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), Madrid, Spain

<sup>c</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Paz (IdiPaz), ISCIII, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 June 2017

Received in revised form 7 July 2017

Accepted 20 July 2017

Available online 22 July 2017

### ABSTRACT

Human induced pluripotent stem cell (iPSC) line was generated from fibroblasts of a patient with propionic acidemia carrying mutations in the *PCCA* gene: c.1899+4\_1899+7delAGTA; p.(Cys616\_Val633del) and c.1430—?\_1643+?del; p.(Gly477Glufs\*9). Reprogramming factors *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* and *c-MYC* were delivered using a non-integrative method based on the Sendai virus. Once established, iPSCs have shown full pluripotency, differentiation capacity and genetic stability.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### Resource table

Unique stem cell line identifier	UAMi001-A
Alternative name of stem cell line	PCCA23-FiPS4F8
Institution	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, CIBERER, IDIPaz, Madrid, Spain
Person who created resource	Esmeralda Alonso-Barroso, Eva Richard
Contact person and email	Eva Richard, <a href="mailto:erichard@cbm.csic.es">erichard@cbm.csic.es</a>
Date archived/stock date	September 17, 2016
Origin	Human skin cells
Type of resource	Biological reagent: induced pluripotent stem cells (iPSC); derived from a patient with propionic acidemia due to defects in the <i>PCCA</i> gene
Sub-type	Human iPSC line
Key transcription factors	<i>OCT3/4</i> , <i>SOX2</i> , <i>c-MYC</i> , <i>KLF4</i> (CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit; Invitrogen by Life Technologies)
Authentication	Identity and purity of cell line confirmed (Fig. 1)
Link to related literature	Not available
Cell line repository/bank	Not applicable
Ethics	Patient informed consent obtained/Ethics Review Board-competent authority approval obtained

### Resource utility

This iPSC line was generated to differentiate into cardiomyocytes and neurons and obtain new disease models. We will investigate the pathophysiology of propionic acidemia disease and evaluate the effects of therapeutic compounds such as antioxidants.

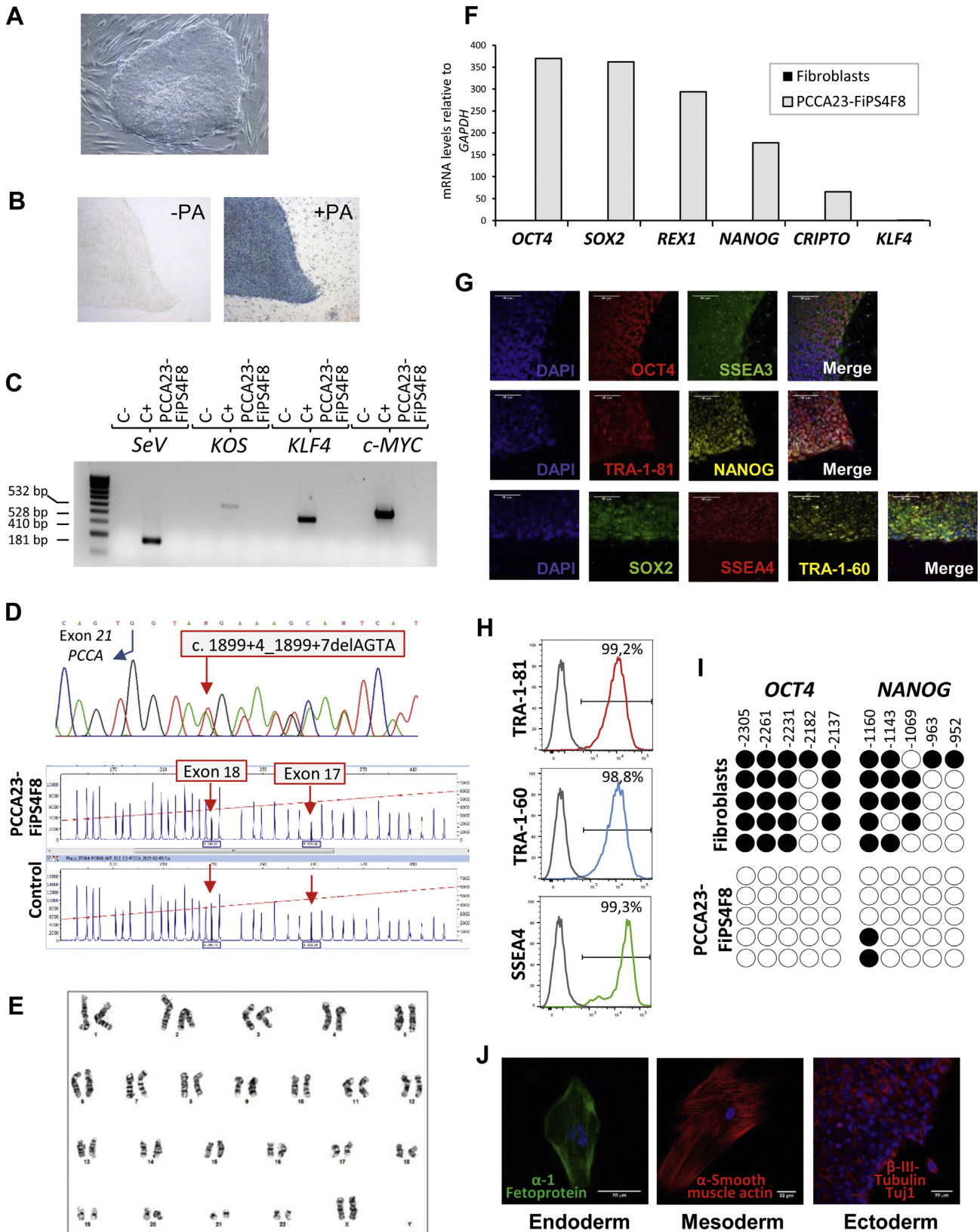
### Resource details

Propionic acidemia (PA) is an inherited metabolic disease caused by mutations in either the *PCCA* or *PCCB* genes (Richard et al., 2015). Fibroblasts from a compound heterozygous PA patient carrying two mutations in the *PCCA* gene (c.1899+4\_1899+7delAGTA; p.(Cys616\_Val633del) and c.1430—?\_1643+?del; p.(Gly477Glufs\*9)) (Desviat et al., 2009) were reprogrammed using the CytoTune™ iPS 2.0 Sendai Reprogramming kit delivering the four human reprogramming factors *OCT3/4*, *SOX2*, *c-MYC* and *KLF4* (Takahashi et al., 2007). The iPSC line PCCA23-FiPS4F8 (UAMi001-A) displayed a typical round shape ESC-like morphology and growth behaviour (Fig. 1A) and the colonies stained positive for alkaline phosphatase activity (Fig. 1B). The clearance of the vectors and the exogenous reprogramming factor genes was observed by RT-PCR after 8 culture passages (Fig. 1C). Mycoplasma testing by a colorimetry assay revealed a negative result (Supplementary Fig. S1A). To analyze the genetic stability, we confirmed the presence of the two mutations in the iPSC line by Sanger sequencing (c.1899+4\_1899+7delAGTA; p.(Cys616\_Val633del) and multiplex ligation probe amplification (MLPA) analysis (c.1430—?\_1643+?del; p.(Gly477Glufs\*9)) revealing exons 17–18 deletion (Fig. 1D); and we also confirmed by DNA fingerprinting analysis that the line was derived from

\* Corresponding author at: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC, C/ Nicolás Cabrera N°1, Universidad Autónoma Madrid, 28049 Madrid, Spain.  
E-mail address: [erichard@cbm.uam.es](mailto:erichard@cbm.uam.es) (E. Richard).

the patient's fibroblasts (Supplementary Fig. S1B). The iPSC line also displayed a normal karyotype (46, XX) after more than twenty culture passages (Fig. 1E). Expression of key pluripotency genes was observed both at RNA level (transcription factors *OCT4*, *SOX2*, *REX1*, *NANOG*, *CRIP1* and

*KLF4*) by qRT-PCR (Fig. 1F), as well as at protein level (transcription factors *OCT4*, *NANOG* and *SOX2*, and surface markers *SSEA3*, *SSEA4*, *TRA-1-60* and *TRA-1-81*) by immunocytochemistry (Fig. 1G) and flow cytometry analysis (Fig. 1H). In addition, methylation analysis of the promoters of the



pluripotency associated genes, *OCT4* and *NANOG*, revealed a heavy methylation in the original fibroblasts and an almost complete demethylation in the iPSC line (Fig. 1I). Finally, the cells had the capacity to form derivatives of all three germ layers (endoderm, mesoderm and ectoderm) upon embryoid body differentiation (Fig. 1J, Table 1).

## Materials and methods

### Non-integrative reprogramming of mutant PCCA fibroblasts into iPSC

The present study included available fibroblasts from a PA patient with defects in the *PCCA* gene. Experimental protocols were approved by the Institutional Ethical Committee of the Universidad Autónoma de Madrid according to Spanish and European Union legislation, and informed consent was obtained from the legal care-givers. Patient-derived fibroblasts were cultured under standard conditions in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 200 mM glutamine and antibiotics. Fibroblasts were reprogrammed using the CytoTune™ iPS 2.0 Sendai Reprogramming kit (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. iPSCs were maintained and expanded both on feeder layers and on feeder-free layers. In the first case, human fibroblasts feeders were mitotically inactivated by gamma irradiation (80 Gy). iPSCs were cultured on top of irradiated human fibroblasts changing every day the iPSC medium containing: knockout DMEM (Life Technologies), 10% knockout serum replacement (Life Technologies), 0.5% human serum albumin (Grifols), 2 mM Glutamax™ (Life Technologies), 100 μM non-essential amino acids (Lonza), 100 μM β-mercaptoethanol (Life Technologies), 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin (Life Technologies) and 10 ng/ml bFGF (Peprotech). For the propagation of iPSC, mechanical procedures were applied using a “stripper” micropipette and 150 μm tips (Mid Atlantic) to carefully lift and aspirate the colony. iPSC were also adapted and cultured in feeder-free conditions on Matrigel® (Corning) using iPSC conditioned medium and, in this case, for the iPSC propagation the enzymatic procedure StemPro® accutase® (Gibco by Life Technologies) was used. iPSC conditioned medium was obtained from feeder layers, supplemented with 10 ng/ml bFGF and filtered.

### Phosphatase alkaline analysis

iPSC colonies were picked and plated onto a P-100 plate with feeders. After six days, direct phosphatase alkaline activity was determined using the Phosphatase Alkaline Blue Membrane Substrate Solution kit (Sigma-Aldrich) following manufacturer's instructions.

### Detection of Sendai virus genome and transgenes

After 8 passages, iPSC line was tested for Sendai virus (SeV) residues. Total RNA was isolated using TRIzol® Reagent (Life Technologies) and 1 μg of RNA was retrotranscribed using NZY First-Strand cDNA Synthesis kit (NZY Tech). RNA from the transduced cell pool at passage zero was used as positive control. PCR was performed using the primers indicated in Table 2 and following the instructions as recommended by the manufacturer.

### Mutation analysis

Genomic DNA from the patient-derived fibroblasts and iPSCs was isolated using MagNA Pure Compact DNA Isolation kit and MagNA Pure Compact instrument (Roche). Subsequently, amplification by PCR of the *PCCA* region containing the c.1899+4\_1899+7delAGTA; p.(Cys616\_Val633del) mutation was carried out using the primers indicated in Table 2, and amplified PCR fragments were sequenced in an ABI3730 sequencer (Applied Biosystems). Detection of c.1430–?\_1643+?del; p.(Gly477Glufs\*9) mutation was performed using the SALSA MLPA P278-C1-PCCA probemix (MRC-Holland) for copy number detection.

### Karyotype analysis

Karyotype analysis of the iPSC line was carried out using cells with more than twenty culture passages which were processed using standard cytogenetic techniques. Briefly, cells were treated with 10 μg/ml of Colcemid® Solution (Irvine Scientific) for 90 min at 37 °C, dissociated by accutase, treated with hypotonic solution and fixed with Carnoy's fixative. Cells were then dropped on a microscope glass slide and dried. Metaphase cells were G banded using Wright staining. At least 20 metaphases were karyotyped. Karyotype analysis was performed at Instituto de Genética Médica y Molecular del Hospital Universitario de La Paz, Madrid, Spain.

### Quantitative PCR analysis

Total RNA from the fibroblasts and iPSCs was isolated using TRIzol® Reagent (Life Technologies). RT-PCR was performed using High Capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystems), and real-time PCR was performed using SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) and LightCycler 480 instrument (Roche), at Parque Científico de Madrid, Campus de Cantoblanco, UAM, Madrid, Spain. Amplification efficiency and sample-to-sample variation were normalized by monitoring *GAPDH*. The expression levels of several pluripotency associated genes (*OCT4*, *SOX2*, *REX1*, *NANOG*, *CRIP1* and *HLF4*) were quantified. Primer sequences were described by (Aasen et al., 2008) (Table 2).

### Immunofluorescence analysis

iPSC were grown on feeder layers on 15 μ-Slide 8 well culture plates (Aasen et al., 2008) and fixed with Formaline Solution 10% (Sigma-Aldrich). The following antibodies were used: TRA-1-60 (Millipore; MAB4360; 1:200); TRA-1-81 (Millipore; MAB4381; 1:200); *SOX2* (Thermo Scientific, PA1-16968, 1:100); *NANOG* (RD Systems, AF1997, 1:25); *SSEA-4* (DSHB, MC-813-70, 1:3); *SSEA-3* (DSHB, MC-631, 1:3); *OCT4* (Santa Cruz Biotechnology, sc-5279, 1:60); β-III Tubulin Tuj1 (Covance, MMS-435P, 1:500); α-1 Fetoprotein (Dako, A0008, 1:400); α-Smooth muscle actin (Sigma-Aldrich, A5228, 1:400) (Table 2). Secondary antibodies used were from Alexa Fluor Series from Jackson ImmunoResearch, Thermo Fisher Scientific and Invitrogen (1:200) (Table 2). For nucleus staining DAPI (Invitrogen, 1:10,000) was used. Images were taken using a Zeiss confocal microscope.

**Fig. 1.** Generation and molecular and functional characterization of the PCCA23-FiPS4F8 iPSC line. (A) Typical embryonic stem cell-like colony morphology obtained after fibroblasts reprogramming. (B) Alkaline phosphatase enzymatic activity staining (right) and unstained iPSC colony (left). (C) RT-PCR for the detection of the exogenous reprogramming factors and Sendai virus vectors. C+: transduced cell pool at passage zero; C-: non-template control. (D) Electropherogram showing mutation c.1899+4\_1899+7delAGTA; p.(Cys616\_Val633del) (top) and MLPA analysis showing the deletion of exons 17 and 18 (mutation c.1430–?\_1643+?del; p.Gly477fs) (bottom) of the iPSC line. (E) Karyotype analysis. (F) qPCR showing the relative gene expression of the endogenous pluripotency associated markers *OCT4*, *SOX2*, *REX1*, *NANOG*, *CRIP1* and *KLF4*. (G) Immunofluorescence analysis with typical embryonic stem cell markers such as transcription factors *OCT4*, *NANOG* and *SOX2*, and surface markers *SSEA3*, *TRA-1-81*, *SSEA4* and *TRA-1-60*; scale bars: 100 μm. (H) Expression analysis of pluripotent markers (*SSEA4*, *TRA-1-81* and *TRA-1-60*) by flow cytometry analysis. (I) Bisulfite sequencing analysis of *OCT4* and *NANOG* promoters. Each horizontal row of circles represents the methylation status of each CpG in one clone. Open circles indicate unmethylated CpG dinucleotides and filled circles, methylated. (J) Immunofluorescence analysis with specific markers of all three primary germ layers after *in vitro* differentiation. Endoderm: α-1-Fetoprotein; mesoderm: α-Smooth muscle actin; ectoderm: β-III-Tubulin Tuj1; scale bars: 50 μm.

**Table 1**  
Characterization and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology	Photography	Visual record of the line: normal	Fig. 1 panel A
Phenotype	Immunocytochemistry	Assess staining/expression of pluripotency and cell surface markers: OCT4, NANOG, SOX2, SSEA3, TRA-1-81, SSEA4 and TRA-1-60	Fig. 1 panel G
Genotype	Flow cytometry	Assess staining/expression of pluripotency markers: SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81	Fig. 1 panel H
	Karyotype (G-banding) and resolution	46XX, Resolution 450–500	Fig. 1 panel E
Identity	Microsatellite PCR (mPCR)	Not performed	
	STR analysis	16 sites tested and all of them matched	Supplementary Fig. 1 panel B
Mutation analysis (IF APPLICABLE)	Sequencing and MLPA analysis	c.1899+4_1899+7del AGTA; p.(Cys616_Val633del) and c.1430-?-1643+?del; p.(Gly477Glufs*9)	Fig. 1 panel D
	Southern Blot OR WGS	Not performed	
Microbiology and virology	Mycoplasma	Mycoplasma testing by a colorimetric assay: negative	Supplementary Fig. 1 panel A
Differentiation potential	Embryoid body formation	Expression of smooth muscle actin, $\beta$ -III-tubulin Tuj1 and $\alpha$ - 1 fetoprotein	Fig. 1 panel J
Donor screening (OPTIONAL)	HIV 1 + 2 Hepatitis B, Hepatitis C	Not performed	
Genotype additional info (OPTIONAL)	Blood group genotyping	Not performed	
	HLA tissue typing	Not performed	

### Flow cytometry analysis

We analysed the pluripotency-associated markers SSEA4, TRA-1-60 and TRA-1-81 by flow cytometry. iPSC were dissociated by incubation with accutase for 5 min. Then, cells were suspended in PBS/2%BSA to a cell density of  $1.5 \times 10^5$  cells per 100  $\mu$ l and incubated with the specific primary antibody (1/100 for TRA-1-60 and TRA-1-81, and no dilution for SSEA4) for 20 min at 4 °C. Cells were washed with PBS/2%BSA and incubated with Alexa Fluor® 647 (1/600) for 20 min at 4 °C. Finally, cells were washed with PBS/2%BSA and analysed using a FACSCanto A (Becton Dickinson) and FlowJo 10.2 software program. An irrelevant isotype-match antibody was always used as a negative control.

### Bisulfite sequencing

Bisulfite modification of genomic DNA was performed with EZ DNA Methylation-Gold™ kit (Zymo Research) following the manufacturer's instructions. Converted DNA was amplified by PCR using primers previously published (Freberg et al., 2007) and Immolase™ Red DNA Polymerase (Bioline). PCR conditions were 95 °C for 8 min and 40 cycles of 94 °C for 1 min, 58 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, followed by 10 min at 72 °C. PCR products were cloned into bacteria by pGEM®-T Easy Vector (Promega) and sequenced using T7 primer. Sequences of 5 bacterial clones per genomic region examined are represented as rows of circles in Fig. 1H with each circle symbolizing the methylation state of one CpG.

**Table 2**  
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry			
	Antibody	Dilution	Company Cat# and RRID
Pluripotency markers	Mouse IgG anti-OCT4	1:60	Santa Cruz Cat# sc-5279, AB_628051
	Rat IgM anti-SSEA3	1:3	Hybridoma Bank Cat# MC-631, AB_528476
	Rabbit IgG anti-SOX2	1:100	Fisher Thermo Scientific Cat# PA1-16968, AB_2195781
	Mouse IgG anti-SSEA4	1:3	HYBRIDOMA Bank Cat# MC-813-70, AB_528477
	Mouse IgM anti-TRA-1-60	1:200	Millipore Cat# MAB4360, AB_2119183
	Goat IgG anti-NANOG human	1:25	R&D Cat# AF1997, AB_355097
	Mouse IgM anti-TRA-1-81	1:200	Millipore Cat# MAB4381, AB_177638
Differentiation markers	Rabbit IgG anti- $\alpha$ -Fetoprotein	1:400	Dako Cat# A0008, AB_2650473
	Mouse IgG anti- $\beta$ -III-Tubulin Tuj1	1:500	Covance Cat# MMS-435P, AB_231377
	Mouse IgG anti- $\alpha$ -smooth muscle actin	1:400	Sigma-Aldrich Cat# A5228, AB_262054
Secondary antibodies	Alexa 555 Donkey anti-Mouse IgG	1:200	Thermo Fischer Cat# A-31570, AB_2536180
	Alexa 488 Goat anti-Rat IgM	1:200	Thermo Fischer Cat# A-21212, AB_2535798
	Alexa 488 Donkey anti-Rabbit IgG	1:200	Thermo Fischer Cat# A-31572, AB_162543
	Alexa 555 Donkey anti-Mouse IgG	1:200	Thermo Fischer Cat# A-31570, AB_2536180
	Alexa 647 Goat anti-Mouse IgM	1:200	Thermo Fischer Cat# A-21238, AB_2535807
	Alexa 647 Donkey anti-Goat IgG	1:200	Thermo Fischer Cat# A-21447, AB_2535864
	Alexa 55 Donkey anti-Mouse IgM Cy3	1:200	Jackson Cat# 715-165-140,
Primers	Target	Forward/Reverse primer (5'-3')	
Reverse transcription-PCR	SeV genome	GGATCACTAGGTGATATCGAGC/ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC	
	KOS transgene	ATGCACCGCTACGACGTGAGCCG/ACCTTGACAATCCTGATGTGG	
	KLF4 transgene	TTCTTCATGCCAGAGGAGCC/ AATGTATCGAAGGTGCTCAA	
Pluripotency Markers (Qpcr)	c-MYC transgene	TAACTGACTAGCAGGCTTGTG/TCACATACAGTCTGGATGATGATG	
	OCT4	GGAGGAAGCTGACAACAATGAAA/GGCCTGCACGAGGGTTT	
	SOX2	TGCCGAGCGCTGCACAT/TCATGAGCGTCTGTGTTTCC	
	NANOG	ACAACTGGCCGAGAATAGCA/GGTTCCAGTCGGGTTTCC	
	CRIP1	CGAACTGTGAGCAGATGT/GGGCAGCCAGGTGTCATG	
	REX1	CCTGCAGCGGAAATAGAAC/GCACACATAGCCATACATAAAGG	
	KLF4	CGAACCCACACAGGTGAGAA/GAGCGGGCCAAATTTCCAT	
House-keeping genes (qPCR)	GAPDH	GCACCTCAAGGCTGAGAAC/AGGGATCTCGTCTCTGGAA	
Targeted mutation analysis/sequencing (PCR)	PCCA-exon 21	TTGATGACATTTGGTTTT/AGCAGTAATGAGCCAAGTTCA	

### *In vitro* differentiation

To perform *in vitro* differentiation analysis, iPSC colonies were first cultured in suspension so that they form large aggregates called embryoid bodies (EBs). EBs differentiate spontaneously to different cell types derived from the three germ layers. iPSCs from a P100 plate treated with matrigel (80% confluency) were dissociated into a single cell suspension with accutase, and resuspended in 12 ml of conditioned medium. EBs formation was induced by seeding 120  $\mu$ l of the iPSC suspension in each well of 96-well v-bottom low attachment plates, and by centrifuging the plates at 800g for 10 min to aggregate the cells. After 2 days, the EBs were transferred to untreated P60 culture plates for 2 days. Subsequently, the EBs were transferred to 15  $\mu$ -Slide 8 well culture plates previously treated with matrigel for 1 h at room temperature, and cultured in differentiation medium (DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum, 2 mM Glutamax™, 100  $\mu$ M non-essential amino acids, 100  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, and 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin) for 2–3 weeks to allow spontaneous endoderm formation. For mesoderm differentiation, EBs were maintained for 2–3 weeks in differentiation medium supplemented with 100  $\mu$ M ascorbic acid (A4403, Sigma-Aldrich). For ectoderm differentiation, EBs were cultured in a special differentiation medium containing (50% DMEM F12, 50% neurobasal medium, 2 mM Glutamax™, 1  $\times$  N2 supplement, 1  $\times$  B27 supplement and 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin) for 2–3 weeks. In all cases, the medium was changed every two days.

### *Mycoplasma* detection

Cells were screened for mycoplasma contamination using a colorimetric assay, Plasmotest™ Mycoplasma Detection Kit (InvivoGen), following the manufacturer's protocol.

### DNA fingerprinting analysis

DNA fingerprinting analysis was performed using the AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific). A total of 1 ng of DNA was used and highly polymorphic regions containing

short tandem repeated sequences were evaluated by the amplification of the following markers (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA and Amelogenin for sex determination) by PCR. Samples were run on a 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) and the analysis was performed using GeneMapper® v4.0, at Parque Científico de Madrid, Campus Moncloa, UCM, Madrid, Spain.

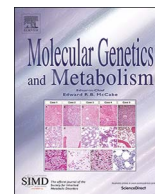
Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2017.07.021>.

### Acknowledgments

This work was supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and European Regional Development Fund (grant numbers SAF2013-43005-R and SAF2016-76004-R). The authors thank INDEPF (Instituto de investigación y desarrollo social de enfermedades poco frecuentes), and E. Mansilla for her excellent assistance in the karyotype analysis (Instituto de Genética Médica y Molecular del Hospital Universitario de La Paz, Madrid, Spain). Centro de Biología Molecular Severo Ochoa receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces (grant number CNXVII).

### References

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boue, S., Izpisua Belmonte, J.C., 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26 (11), 1276–1284.
- Desviat, L.R., Sanchez-Alcudia, R., Perez, B., Perez-Cerda, C., Navarrete, R., Vijzelaar, R., Ugarte, M., 2009. High frequency of large genomic deletions in the PCCA gene causing propionic acidemia. *Mol. Genet. Metab.* 96 (4), 171–176.
- Freberg, C.T., Dahl, J.A., Timoskainen, S., Collas, P., 2007. Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol. Biol. Cell* 18 (5), 1543–1553.
- Richard, E., Perez, B., Perez-Cerda, C., Desviat, L.R., 2015. Understanding molecular mechanisms in propionic acidemia and investigated therapeutic strategies. *Expert Opin. Orphan Drugs* 3 (12), 1427–1438.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5), 861–872.



## Treatment with antioxidants ameliorates oxidative damage in a mouse model of propionic acidemia



Ana Rivera-Barahona<sup>a</sup>, Esmeralda Alonso-Barroso<sup>a</sup>, Belén Pérez<sup>a</sup>, Michael P. Murphy<sup>b</sup>,  
Eva Richard<sup>a,1</sup>, Lourdes R. Desviat<sup>a,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM-CSIC, Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), CIBERER, IdiPaz, Universidad Autónoma, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Medical Research Council-Mitochondrial Biology Unit, University of Cambridge, UK

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Propionic acidemia  
Antioxidants  
MitoQ  
Resveratrol

### ABSTRACT

Oxidative stress contributes to the pathogenesis of propionic acidemia (PA), a life threatening disease caused by the deficiency of propionyl CoA-carboxylase, in the catabolic pathway of branched-chain amino acids, odd-number chain fatty acids and cholesterol. Patients develop multisystemic complications including seizures, extrapyramidal symptoms, basal ganglia deterioration, pancreatitis and cardiomyopathy. The accumulation of toxic metabolites results in mitochondrial dysfunction, increased reactive oxygen species and oxidative damage, all of which have been documented in patients' samples and in a hypomorphic mouse model. Here we set out to investigate whether treatment with a mitochondria-targeted antioxidant, MitoQ, or with the natural polyphenol resveratrol, which is reported to have antioxidant and mitochondrial activation properties, could ameliorate the altered redox status and its functional consequences in the PA mouse model. The results show that oral treatment with MitoQ or resveratrol decreases lipid peroxidation and the expression levels of DNA repair enzyme OGG1 in PA mouse liver, as well as inducing tissue-specific changes in the expression of antioxidant enzymes. Notably, treatment decreased the cardiac hypertrophy marker BNP that is found upregulated in the PA mouse heart. Overall, the results provide in vivo evidence to justify more in depth investigations of antioxidants as adjuvant therapy in PA.

### 1. Introduction

Mitochondria are intracellular dynamic organelles that play an essential role in mammalian cell energy metabolism. Most cell energy is obtained through mitochondrial metabolic pathways, especially the Krebs cycle and electron transport chain that is the main site for production of reactive oxygen species (ROS). Energy-demanding tissues are highly sensitive to oxidative stress due to their high rate of oxygen consumption, substantial iron and polyunsaturated lipid contents, and relatively low activity of their antioxidant defence and repair enzymes [1]. Consequently, energy metabolism impairment and oxidative stress are relevant processes that have been involved in the pathophysiology of many human pathologies, including neurodegenerative, cardiovascular and inherited metabolic diseases (IMDs) [2–7].

One of the IMDs in which a secondary mitochondrial dysfunction and associated oxidative stress has been described is the rare

neurometabolic disease propionic acidemia (PA, MIM#606054). PA, the most frequent, life-threatening organic acidemia with an incidence of 1 in 100,000 inhabitants, is caused by mutations in either the *PCCA* or *PCCB* genes, encoding both subunits of the mitochondrial propionyl-CoA carboxylase (PCC) enzyme. PCC is responsible for the generation of *D*-methylmalonyl-CoA from propionyl-CoA, which derives from the catabolism of some amino acids (isoleucine, valine, threonine and methionine), odd-chain fatty acids, and cholesterol [8]. The accumulation of propionyl-CoA is considered to be the major toxic agent, and in addition, there is the accumulation of metabolites of alternative propionate oxidation. Together they cause hyperammonaemia via inhibition of *N*-acetylglutamate synthetase and OXPHOS deficiency by synergistic inhibition of pyruvate dehydrogenase complex,  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex and complex III, as well as inhibition of succinyl-CoA synthetase [9]. Besides, mtDNA depletion and ultrastructural mitochondrial abnormalities have been described in

**Abbreviations:** BNP, brain natriuretic peptide; CAT, catalase; CYPD, cyclophilin D; GPX1, glutathione peroxidase; MDA, malondialdehyde; OGG1, 8-oxoguanine DNA glycosylase 1; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances

\* Corresponding author at: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

E-mail address: [lruiz@cbm.csic.es](mailto:lruiz@cbm.csic.es) (L.R. Desviat).

<sup>1</sup> Shared senior authorship.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.07.009>

Received 23 May 2017; Received in revised form 24 July 2017; Accepted 24 July 2017

Available online 25 July 2017

1096-7192/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

patients' tissues [9–12]. Increased intracellular hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) levels, correlating with the activation of the JNK and p38 signalling pathways, and high levels of oxidative stress markers have also been observed in patient-derived fibroblasts and urinary samples [13,14]. Furthermore, we have shown that the hypomorphic PA mouse model ( $Pcca^{-/-}$  (A138T)) showed tissue-specific alterations in OXPHOS complexes and/or activities, mtDNA depletion, an increase in superoxide production and  $H_2O_2$  levels, as well as variations in antioxidant defences and lipid oxidative damage [15].

Clinical presentation of PA varies from a severe, early-onset form of the disease, with neonatal ketoacidosis, lethargy, failure to thrive and encephalopathy, to a milder late-onset presentation usually diagnosed during infancy which has a less serious neurological outcome [12]. Long-term complications have also been described including growth retardation and developmental delay, poor cognitive outcome and progressive neurological dysfunction by basal ganglia degeneration, skin lesions, pancreatitis, cardiomyopathy and rhythm disturbances [12]. If not promptly and appropriately treated, patients can die or develop permanent brain damage. Conventional treatment is based on dietary restriction, carnitine and biotin supplementation, and metronidazole, and these have allowed patients to live beyond the neonatal period [16].

Despite improved therapy over the past few decades, the outcome of PA patients is still unsatisfactory, highlighting the requirement to evaluate new therapies. Considering the hypothesis that secondary mitochondrial dysfunction resulting in increased ROS and oxidative damage plays a major role in the pathomechanisms of PA, we have focused our research in the potential therapeutic applications of antioxidant compounds in this disease. In a previous study using patient-derived fibroblasts we observed that different antioxidants (Tiron, Trolox, resveratrol and MitoQ) significantly reduced  $H_2O_2$  levels and also regulated the expression of antioxidant enzymes [17]. In this work we have used the hypomorphic murine model of PA to investigate the in vivo effects of two selected antioxidants acting on mitochondrial oxidative stress: i) mitochondrial targeted MitoQ, which is thought to act primarily by decreasing mitochondrial lipid peroxidation [18] and ii) resveratrol, with potent antioxidant properties acting through various mechanisms, including the upregulation of antioxidant enzymes and the enhancement of mitochondrial biogenesis [19].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mice handling

All mice used, wild-type and hypomorphic  $Pcca^{-/-}$  (A138T) (kindly provided by Prof. M.A. Barry, Mayo Clinic, US) [20], were adult males or females in an FVB background. Mice were maintained on standard chow. Animal experiments were carried out in a pathogen-free environment at the Animal Facility of Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, in accordance with the Spanish Law on Animal Protection. All animal studies were approved by the Institutional Animal Experimentation Ethical Committee (Universidad Autónoma de Madrid, reference CEI 963-A026) and by the Regional Environment Department (Comunidad de Madrid, reference PROEX 22/14). Genotyping was performed using genomic DNA isolated from tail biopsies as previously described [20,21].

### 2.2. Antioxidant treatment trials

Wild-type and hypomorphic  $Pcca^{-/-}$  (A138T) mice were randomly divided into the following groups: non-treated [wild-type ( $n = 12$ ) and  $Pcca^{-/-}$  (A138T) ( $n = 11$ )], MitoQ-treated [wild-type ( $n = 12$ ) and  $Pcca^{-/-}$  (A138T) ( $n = 11$ )] and resveratrol-treated [wild-type ( $n = 10$ ) and  $Pcca^{-/-}$  (A138T) ( $n = 11$ )]. Mice were 7 months of age at the start of both treatments. MitoQ was administered at a concentration of 250  $\mu$ M in drinking water for 3 months. In a previous study, doses up to

500  $\mu$ M showed no toxicity and had no significant effect on animal body weight or food and liquid consumption [22]. The resveratrol group received 30 mg/L of resveratrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in their drinking water for 2 months. Fresh MitoQ and resveratrol solutions were prepared twice a week and administered in light-protected water bottles. Water intake was monitored weekly until the end of the study.

### 2.3. Western blotting

Wild-type and hypomorphic  $Pcca^{-/-}$  (A138T) mice were euthanized and brain, heart and liver tissues were immediately excised, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until processed. Proteins from mouse tissues were isolated by disrupting 50–100 mg wet weight of the mice organs in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.4 mM EDTA) using a T10 basic Ultra-Turrax homogenizer (IKA, Germany) and centrifuged 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant fraction was collected and protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Equal amounts of lysed extracts (75  $\mu$ g protein) were loaded on a 12% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (iBlot® Gel Transfer Stacks, Regular) in an iBlot® Gel transfer device (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Immunodetection was carried out using commercially available antibodies against MnSOD (1:1000; Enzo Life Sciences Cat# ADI-SOD-110, RRID:AB\_10616816), GPx1 (1:1000; Abcam Cat# ab22604, RRID:AB\_2112120), CAT (1:500–1:1000; Abcam Cat# ab22604, RRID:AB\_2112120), CypD (1:1000; Abcam Cat# ab110324, RRID:AB\_10864110) and OGG1 (1:1000; Novus Cat# NB100-106, RRID:AB\_10104097). Secondary antibodies used were goat anti-rabbit (1:5000; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-2004, RRID:AB\_631746) or goat anti-mouse (1:5000; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-2005, RRID:AB\_631736). For loading control, membranes were immunostained with GAPDH antibody (1:5000; Abcam Cat# ab8245, RRID:AB\_2107448). Antibody binding was detected by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Protein quantification was performed using a calibrated densitometer GS-800 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### 2.4. RNA isolation and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from the heart using miRCURY™ RNA Isolation Kit-Tissue (Exiqon, Vedbaek, Denmark) according to the manufacturer's instructions. RNA yield was assessed using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Rockland, DE, USA). 250 ng of total RNA was retrotranscribed using the NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYTech, Lisboa, Portugal). The *Nppb* gene (coding for the pro-hypertrophic marker BNP) was amplified with specific primers previously described [23] using PerfeCTa SYBR Green Fast Mix Kit (Quantabio, Beverly, MA, USA) in a LightCycler480 II (Roche Applied Biosciences, In, USA) instrument. GAPDH (Forward primer: AGCTGAACGGGAAGCTCACT; Reverse primer: GCTTCACCACCTTCTTGATGTC) was used as endogenous control. All samples were run in triplicate and mRNA relative expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

### 2.5. TBARS assay

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured using Oxiselect TBARS MDA quantitation kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). 50 mg of frozen tissue were homogenized using a T10 basic Ultra-Turrax homogenizer (IKA, Germany) and malondialdehyde (MDA) was measured following the manufacturer's instructions. Each sample was run in triplicate using a FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) fluorescence plate reader. Tissue protein content was measured using the Bradford method (Bio-Rad

protein assay). MDA levels were normalized and expressed as fold change.

### 2.6. Statistical analysis

All data was analysed using IBM SPSS Statistics for Windows Version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Data are presented as mean  $\pm$  SD and statistical differences were calculated using the Student *t*-test or ANOVA followed by the Tukey's honestly significant difference (HSD) or Games Howell post hoc test. Values with  $p < 0.05$  were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. MitoQ and resveratrol treatment ameliorates oxidative damage in different PA mice tissues

In this work, we investigated whether MitoQ and resveratrol could be used in vivo as adjuvant treatments in PA to mitigate alterations in redox homeostasis. To this end, we administered these compounds orally to wild type and hypomorphic *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice and measured oxidative stress parameters in different tissues. Lipid peroxidation using TBARS assay was monitored in brain, heart and liver (Fig. 1). Untreated *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice showed increased MDA content compared to their wild-type counterparts in all tissues analysed, as previously reported [15]. Resveratrol could significantly reduce lipid peroxidation in heart and liver of *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice, while MitoQ was only effective in the liver (Fig. 1).

Increased ROS can also cause DNA base damage, and 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxoG) is the most common alteration observed under oxidative stress [24]. 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) recognizes this damage and repairs it through the base excision repair pathway. OGG1 expression is induced by DNA oxidative damage and thus its expression levels provide a marker of cellular oxidative stress [25]. We could observe no significant differences in OGG1 levels between wild-type and PA mice in heart or brain samples (data not shown), but in liver samples a 3 to 4-fold increase was detected (Fig. 2A). After MitoQ and resveratrol treatments, we observed a significant decrease in OGG1 protein levels in the liver of *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice (Fig. 2B and C) compared to non-treated animals, indicating a probable effect of both compounds in decreasing ROS damage to DNA.

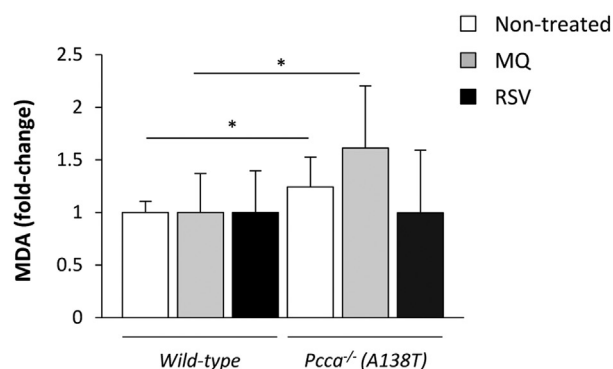
### 3.2. Antioxidant defences are modulated by MitoQ and resveratrol treatment

The observed decrease in lipid peroxidation in PA mice samples could be due, in part, to the up-regulation of antioxidant defences, so we decided to monitor them in the cohort of untreated and treated mice. We observed an increase in MnSOD and CAT protein levels in liver samples from *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice treated with MitoQ (Fig. 3A). No significant differences in antioxidant enzyme levels were observed for brain and heart samples in these mice (data not shown). On the other hand, resveratrol induced the expression of GPx1 in brain and heart, and of catalase in heart and liver of treated *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice compared to non-treated mice (Fig. 3B, C, and D).

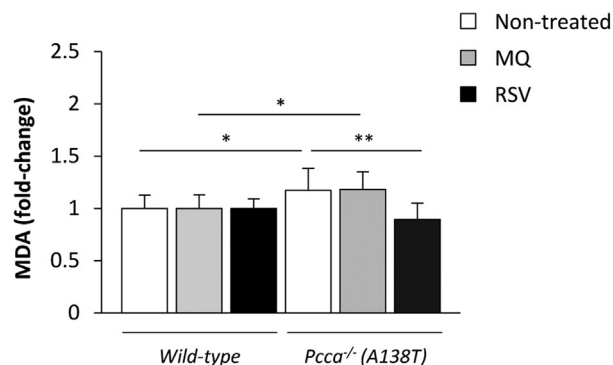
### 3.3. Oxidative stress-modulated cyclophilin D protein levels are reduced by resveratrol treatment

Oxidative stress has been reported to promote cyclophilin D (CYPD) overexpression [26], a key component of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Increased CYPD expression leads to mPTP opening and cell death, thus contributing to the pathogenesis of different human diseases [27,28]. We could confirm an increase in CYPD protein levels in liver samples of untreated PA mice compared to littermate controls, indicating the presence of oxidative stress (Fig. 4A).

## A) Brain



## B) Heart



## C) Liver

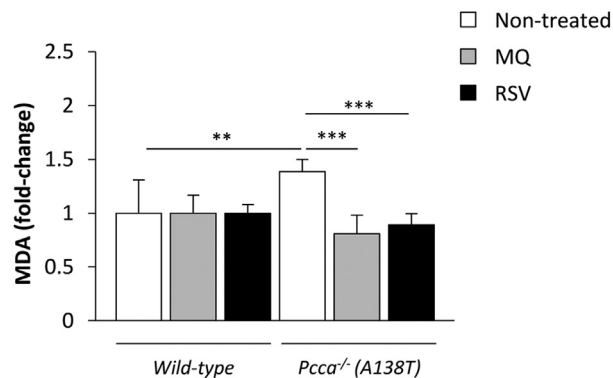


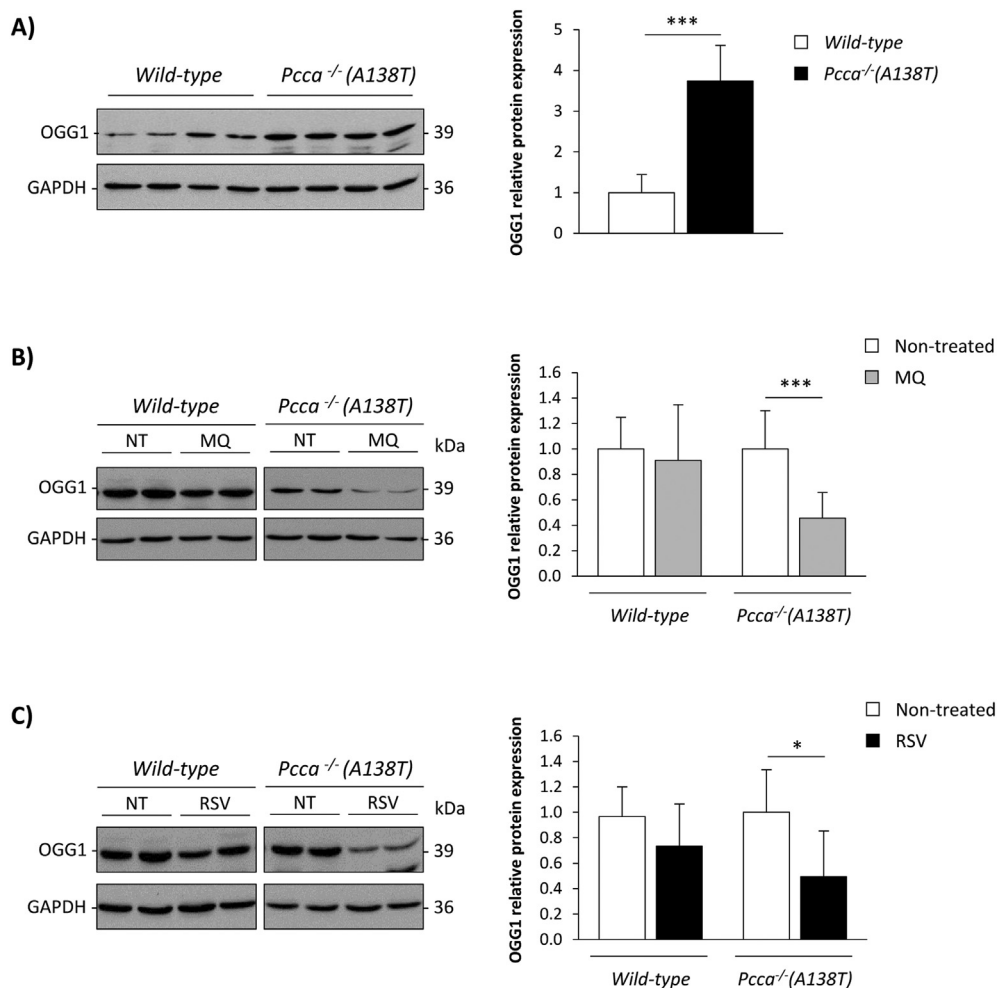
Fig. 1. Lipid peroxidation analysis in (A) brain, (B) heart and (C) liver from non-treated, MitoQ (MQ) or resveratrol (RSV)-treated wild-type and *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice. MDA levels were measured in triplicate. The figure shows the relative levels (mean  $\pm$  SD) and statistical significance was measured by ANOVA followed by the Tukey's honestly significant difference (HSD) or Games Howell post hoc test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Resveratrol treatment diminishes CYPD levels in PA mice compared to non-treated (Fig. 4B). However, MitoQ-treated mice did not show significant differences in CYPD levels (Fig. 4C).

### 3.4. Cardiac hypertrophy markers are normalized in *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice after resveratrol treatment

Cardiomyopathies (hypertrophic and dilated) and arrhythmias are one of the most common long-term complications observed in PA patients [29,30]. A significant increase in *Nppb* mRNA, encoding brain natriuretic peptide (BNP), a biomarker of cardiac hypertrophy and dysfunction, was found in heart of the hypomorphic PA mice,





**Fig. 2.** Analysis of OGG1 protein levels in liver samples from (A) non-treated, (B) MitoQ (MQ) or (C) resveratrol (RSV)-treated wild-type and *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice. Representative western blots are shown on the left, showing OGG1 levels and GAPDH as loading control. Histograms showing the fold-change after protein quantification by laser densitometry are shown on the right. Data represent the mean  $\pm$  SD and statistical significance was determined by Student's *t*-test. \**p* < 0.05; \*\*\**p* < 0.001.

correlating with an increase in heart size [20,31]. Transcription of the *Nppb* gene is driven by GATA4 and NFAT transcription factors, among others [32,33]. Resveratrol treatment has been suggested as a promising treatment for cardiac hypertrophy as it inhibits AKT activity and, therefore, NFAT-mediated transcription of its target genes [34]. MitoQ has been shown to reduce cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, through the attenuation of mitochondrial-specific oxidative damage and improvement of endothelial function [35]. As shown in Fig. 5, both resveratrol and MitoQ oral treatments significantly reduced altered BNP expression in *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice, revealing an additional mechanism favouring their potential therapeutic use in PA.

#### 4. Discussion

Mitochondrial oxidative stress is a pathological mechanism shared by many diseases, including neurodegenerative, cardiovascular diseases and IMDs. Thus, the use of antioxidants as potential therapies holds great interest, although in clinical trials different antioxidants have provided limited clinical effects [36,37], probably due to pharmacokinetic and/or pharmacodynamic reasons. This has been the case of the natural polyphenol resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) with multiple reported therapeutic effects in preclinical studies, including potent antioxidant properties [38]. In animal models, resveratrol has been shown to modulate different signalling pathways, antioxidant and anti-inflammatory genes expression, thus ameliorating mitochondrial dysfunction through redox-dependent mechanisms [39]. However, discrepancies and conflicting information exist regarding its beneficial

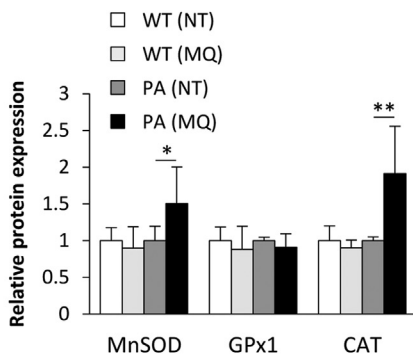
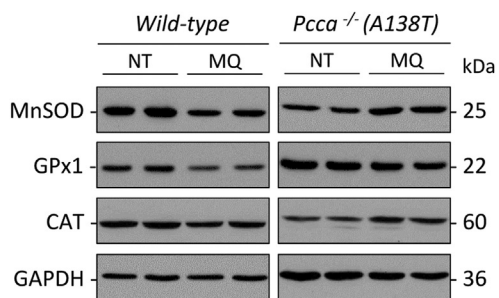
effects in clinical trials [38].

Lack of success of antioxidants in vivo may also be explained by the limited amount of antioxidant actually located in the mitochondria, where oxidative damage initiates. To counteract this, mitochondria-targeted antioxidants such as MitoQ have been developed [40]. MitoQ consists of the lipophilic cation triphenylphosphonium conjugated to ubiquinone that selectively accumulates within mitochondria driven by the membrane potential [18]. In vivo studies have shown that MitoQ can protect against oxidative damage in several animal models of disease and has to date been evaluated in human clinical trials for Parkinson's disease and chronic hepatitis C [40].

In a previous work, we showed that the hypomorphic mouse model of PA exhibited increased ROS, altered antioxidant defences and lipid peroxidation in different tissues, concomitant to a secondary mitochondrial dysfunction [15]. These findings and those of other authors, indicative of an altered redox status and mitochondrial function in patients' samples [9–14], provide a basis to understand pathophysiological changes in PA. Different antioxidants including MitoQ and resveratrol successfully reduced ROS levels in PA patients-derived fibroblasts [17].

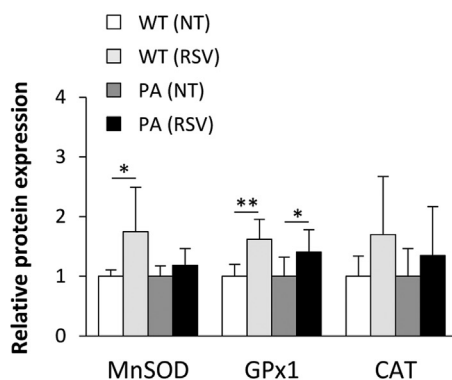
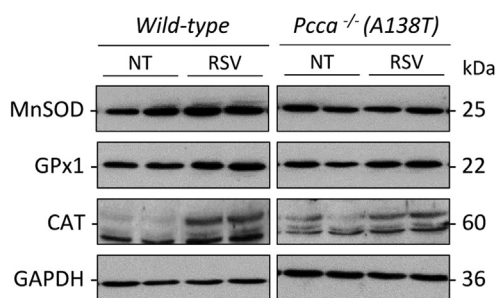
In this work, we have revealed the protective effect of MitoQ and of resveratrol against oxidative damage that contributes to organ pathophysiology in the hypomorphic mouse model of PA. In the MitoQ and resveratrol treated PA mice we observed tissue-specific decreases in oxidative damage biomarkers, probably reflecting differences in tissue bioavailability of the compounds after oral administration. MitoQ has been shown to be readily taken up by different tissues although it accumulates preferentially in liver and kidney, and to a far lower extent in

**A) Liver (MQ)**

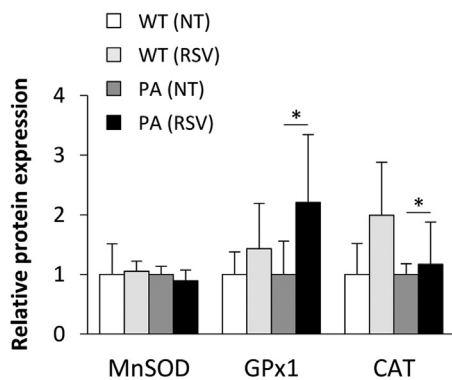
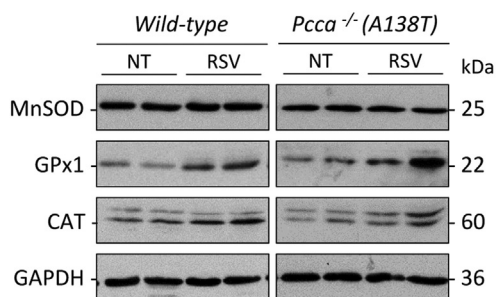


**Fig. 3.** Analysis of MnSOD, GPx1 and CAT protein levels in (A) liver samples from non-treated (NT) or MitoQ (MQ)-treated mice and (B) brain, (C) heart and (D) liver samples from non-treated (NT) or resveratrol (RSV)-treated mice. The left panels show representative blots with GAPDH as loading control. Histograms showing the fold-change after protein quantification by laser densitometry are shown on the right. Data represent the mean ± SD and statistical significance was determined by Student's *t*-test. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01.

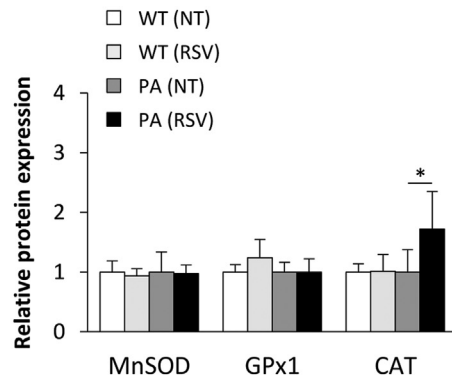
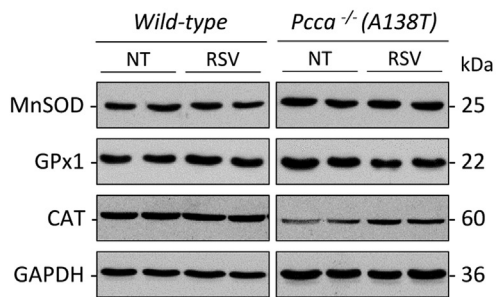
**B) Brain (RSV)**

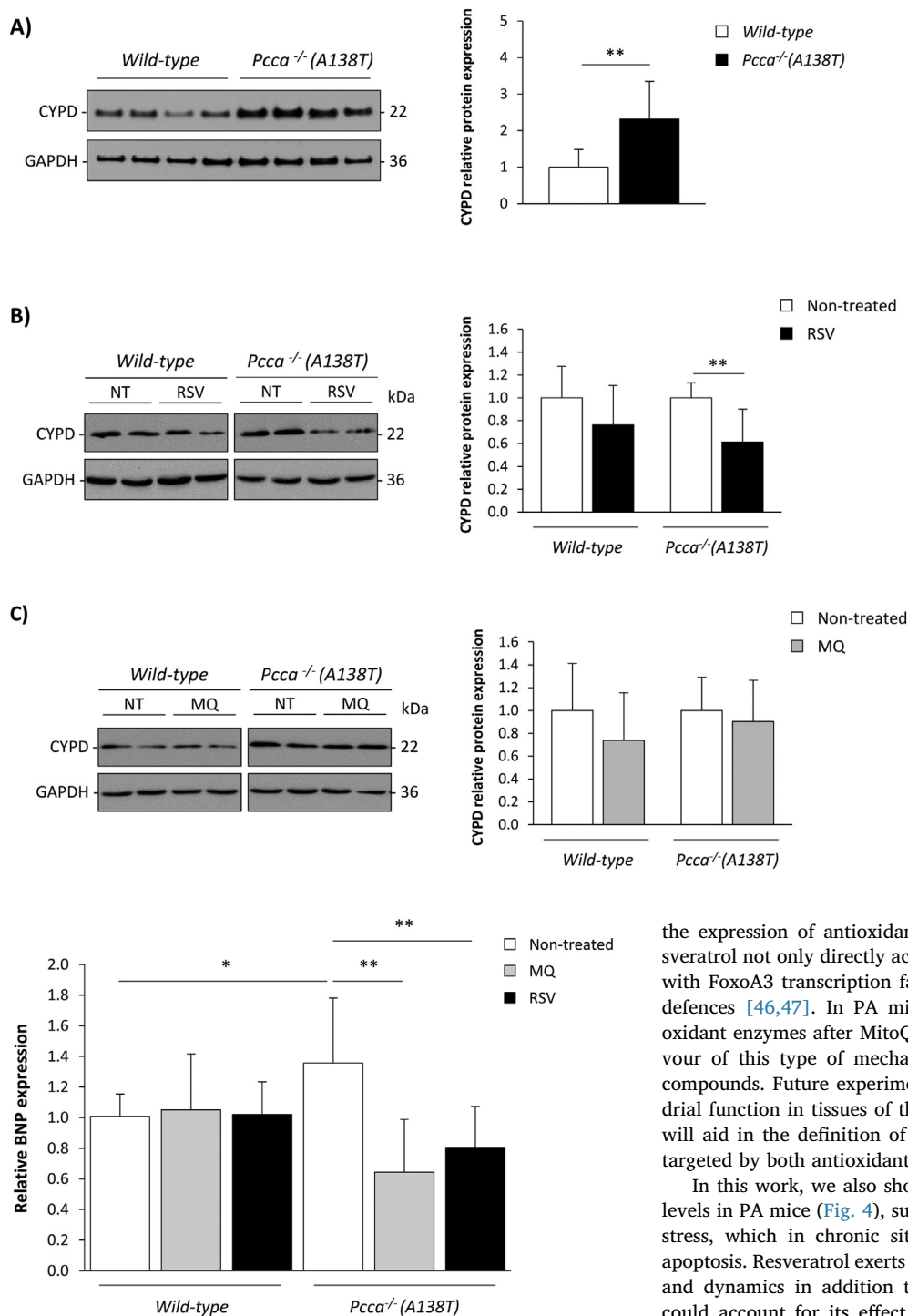


**C) Heart (RSV)**



**D) Liver (RSV)**





**Fig. 4.** Analysis of CYPD protein levels in liver samples from (A) non-treated, (B) Resveratrol (RSV) or (C) MitoQ (MQ)-treated wild-type and *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice. Representative western blots are shown on the left, showing CYPD levels and GAPDH as loading control. Histograms showing the fold-change after protein quantification by laser densitometry are shown on the right. Data represent mean  $\pm$  SD and statistical significance was determined by Student's *t*-test. \*\**p* < 0.01.

**Fig. 5.** Relative levels of *Nppb* (BNP) in heart samples from non-treated, MitoQ (MQ) and resveratrol (RSV)-treated mice. The analysis was performed by qRT-PCR and samples were run in triplicate. Data represent mean  $\pm$  SD and statistical significance was measured by ANOVA followed by the Tukey's honestly significant difference (HSD). \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01.

the brain [41]. Resveratrol has low oral bioavailability, but does show significant uptake in to the heart [39].

Present evidence indicates that the effect of compounds such as MitoQ and resveratrol may be attributed, at least in part, to the induction of the expression of antioxidant enzymes involved in redox homeostasis. MitoQ can promote in some circumstances oxidation and inhibition of Keap1, an oxidative stress sensor protein that regulates the Nrf2 transcription factor [42–44]. Nrf2 is involved in the regulation of

the expression of antioxidant enzymes [45]. On the other hand, resveratrol not only directly activates Nrf2 but also Sirt1, which together with FoxoA3 transcription factor drives the expression of antioxidant defences [46,47]. In PA mice, we confirmed the induction of antioxidant enzymes after MitoQ and resveratrol treatment, arguing in favour of this type of mechanisms contributing to the effect of both compounds. Future experiments examining ROS levels and mitochondrial function in tissues of the MitoQ and resveratrol treated PA mice will aid in the definition of the cellular pathophysiological processes targeted by both antioxidants.

In this work, we also show that resveratrol normalizes liver CYPD levels in PA mice (Fig. 4), supporting its effect counteracting oxidative stress, which in chronic situations may trigger mPTP opening and apoptosis. Resveratrol exerts different effects on mitochondrial function and dynamics in addition to its antioxidant properties [39], which could account for its effect on mPTP opening, although the precise underlying mechanism is unclear at this stage.

Of note, we have shown that PA mice under resveratrol or MitoQ treatment normalized BNP expression levels, indicating that progression of cardiac hypertrophy, a hallmark of PA, may be delayed or reversed. It will be interesting to characterize in detail heart function parameters in untreated and treated PA mice using echocardiographic, histological and morphometric analysis, as well as other relevant clinical (neurological pathology) and biochemical (lactic acid, blood pH) parameters in order to better evaluate the effect of antioxidants in a preclinical setting on the development of multi-organ complications.

In addition to their potential in halting the progression of long-term complications, antioxidants could be of therapeutic value in episodic metabolic decompensations presented by PA patients. These life-threatening episodes, often precipitated by illnesses, infections or

catabolic stress, are characterized by acidosis, hyperammonemia, seizures and encephalopathy, among other symptoms [48]. In these situations, the acutely deranged metabolism may exacerbate pathological ROS production and pharmacological intervention with antioxidants may provide additional benefit in patients' management.

To date, novel approaches are being pursued in the field of antioxidant therapy, e.g. the use of more modern indirect antioxidants that target specific redox enzymes or Nrf2 activators that upregulate cellular antioxidant defences [37]. As the field develops, the hypomorphic PA mouse represents a useful model for the evaluation of these type of compounds as adjuvant therapies in PA disease.

## Acknowledgements

The technical assistance of I. Manso is gratefully acknowledged. The authors thank Dr M.A. Barry for providing the *Pcca*<sup>-/-</sup>(A138T) mice.

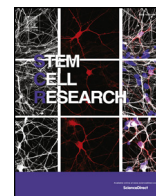
## Funding

This work was supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and European Regional Development Fund (grant numbers SAF2013-43005-R and SAF2016-76004-R). Centro de Biología Molecular Severo Ochoa receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

## References

- [1] E.L. Streck, G.A. Czapski, C. Goncalves da Silva, Neurodegeneration, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress, *Oxidative Med. Cell. Longev.* (2013) 826046 (2013).
- [2] S. DiMauro, E.A. Schon, Mitochondrial disorders in the nervous system, *Annu. Rev. Neurosci.* 31 (2008) 91–123.
- [3] J.K. Andersen, Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence, *Nat. Med.* (10 Suppl) (2004) S18–25.
- [4] E.A. Schon, G. Manfredi, Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 303–312.
- [5] E. Richard, A. Alvarez-Barrientos, B. Perez, L.R. Desviat, M. Ugarte, Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway, *J. Pathol.* 213 (2007) 453–461.
- [6] M. Wajner, S.I. Goodman, Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies, *J. Bioenerg. Biomembr.* 43 (2011) 31–38.
- [7] E. Richard, L.R. Desviat, M. Ugarte, B. Perez, Oxidative stress and apoptosis in homocystinuria patients with genetic remethylation defects, *J. Cell. Biochem.* 114 (2013) 183–191.
- [8] W.A. Fenton, R.A. Gravel, L.E. Rosenberg, Disorders of propionate and methylmalonate metabolism, in: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W. Sly, D. Valle (Eds.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 2165–2190.
- [9] M.A. Schwab, S.W. Sauer, J.G. Okun, L.G. Nijtmans, R.J. Rodenburg, L.P. van den Heuvel, S. Drose, U. Brandt, G.F. Hoffmann, H. Ter Laak, S. Kolker, J.A. Smeitink, Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins, *Biochem. J.* 398 (2006) 107–112.
- [10] Y. de Keyser, V. Valayannopoulos, J.F. Benoist, F. Batteux, F. Laccaille, L. Hubert, D. Chretien, B. Chadeffaux-Vekemans, P. Niaudet, G. Touati, A. Munnich, P. de Lonlay, Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria, *Pediatr. Res.* 66 (2009) 91–95.
- [11] S. Yano, L. Li, T.P. Le, K. Moseley, A. Guedalia, J. Lee, I. Gonzalez, R.G. Boles, Infantile mitochondrial DNA depletion syndrome associated with methylmalonic aciduria and 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase deficiencies in two unrelated patients: a new phenotype of mtDNA depletion syndrome, *J. Inher. Metab. Dis.* 26 (2003) 481–488.
- [12] E. Richard, B. Perez, C. Perez-Cerda, L.R. Desviat, Understanding molecular mechanisms in propionic acidemia and investigated therapeutic strategies, *Expert Opin. Orphan Drugs* 3 (2015) 1427–1438.
- [13] L. Gallego-Villar, C. Perez-Cerda, B. Perez, D. Abia, M. Ugarte, E. Richard, L.R. Desviat, Functional characterization of novel genotypes and cellular oxidative stress studies in propionic acidemia, *J. Inher. Metab. Dis.* 36 (2013) 731–740.
- [14] P.J. Mc Guire, A. Parikh, G.A. Diaz, Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism, *Mol. Genet. Metab.* 98 (2009) 173–180.
- [15] L. Gallego-Villar, A. Rivera-Barahona, C. Cuevas-Martin, A. Guenzel, B. Perez, M.A. Barry, M.P. Murphy, A. Logan, A. Gonzalez-Quintana, M.A. Martin, S. Medina, A. Gil-Izquierdo, J.M. Cuezva, E. Richard, L.R. Desviat, In vivo evidence of mitochondrial dysfunction and altered redox homeostasis in a genetic mouse model of propionic acidemia: implications for the pathophysiology of this disorder, *Free Radic. Biol. Med.* 96 (2016) 1–12.
- [16] H.O. de Baulny, J.F. Benoist, O. Rigal, G. Touati, D. Rabier, J.M. Saudubray, Methylmalonic and propionic acidemias: management and outcome, *J. Inher. Metab. Dis.* 28 (2005) 415–423.
- [17] L. Gallego-Villar, B. Perez, M. Ugarte, L.R. Desviat, E. Richard, Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452 (2014) 457–461.
- [18] G.F. Kelso, C.M. Porteous, C.V. Coulter, G. Hughes, W.K. Porteous, E.C. Ledgerwood, R.A. Smith, M.P. Murphy, Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4588–4596.
- [19] S. Koene, J. Smeitink, Metabolic manipulators: a well-founded strategy to combat mitochondrial dysfunction, *J. Inher. Metab. Dis.* 34 (2011) 315–325.
- [20] A.J. Guenzel, S.E. Hofherr, M. Hillestad, M. Barry, E. Weaver, S. Venezia, J.P. Kraus, D. Matern, M.A. Barry, Generation of a hypomorphic model of propionic acidemia amenable to gene therapy testing, *Mol. Ther.* 21 (2013) 1316–1323.
- [21] S.E. Hofherr, J.S. Senac, C.Y. Chen, D.J. Palmer, P. Ng, M.A. Barry, Short-term rescue of neonatal lethality in a mouse model of propionic acidemia by gene therapy, *Hum. Gene Ther.* 20 (2009) 169–180.
- [22] S. Rodriguez-Cuenca, H.M. Cocheme, A. Logan, I. Abakumova, T.A. Prime, C. Rose, A. Vidal-Puig, A.C. Smith, D.C. Rubinsztein, I.M. Fearnley, B.A. Jones, S. Pope, S.J. Heales, B.Y. Lam, S.G. Neogi, I. McFarlane, A.M. James, R.A. Smith, M.P. Murphy, Consequences of long-term oral administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ to wild-type mice, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 161–172.
- [23] M.V. Cannon, H.H. Sillje, J.W. Sijbesma, M.A. Khan, K.R. Steffensen, W.H. van Gilst, R.A. de Boer, LXalpha improves myocardial glucose tolerance and reduces cardiac hypertrophy in a mouse model of obesity-induced type 2 diabetes, *Diabetologia* 59 (2016) 634–643.
- [24] D.E. Barnes, T. Lindahl, Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 445–476.
- [25] C.L. Powell, J.A. Swenberg, I. Rusyn, Expression of base excision DNA repair genes as a biomarker of oxidative DNA damage, *Cancer Lett.* 229 (2005) 1–11.
- [26] J. Lopez-Erauskin, J. Galino, P. Bianchi, S. Fourcade, A.L. Andreu, I. Ferrer, C. Munoz-Pinedo, A. Pujol, Oxidative stress modulates mitochondrial failure and cyclophilin D function in X-linked adrenoleukodystrophy, *Brain* 135 (2012) 3584–3598.
- [27] V.K. Rao, E.A. Carlson, S.S. Yan, Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration, *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2014) 1267–1272.
- [28] S. Yan, F. Du, L. Wu, Z. Zhang, C. Zhong, Q. Yu, Y. Wang, L.F. Lue, D.G. Walker, J.T. Douglas, S.S. Yan, F1F0 ATP synthase-cyclophilin D interaction contributes to diabetes-induced synaptic dysfunction and cognitive decline, *Diabetes* 65 (2016) 3482–3494.
- [29] L. Pena, J. Franks, K.A. Chapman, A. Gropman, N. Ah Mew, A. Chakrapani, E. Island, E. MacLeod, D. Matern, B. Smith, K. Stagni, V.R. Sutton, K. Ueda, T. Urv, C. Venditti, G.M. Enns, M.L. Summar, Natural history of propionic acidemia, *Mol. Genet. Metab.* 105 (2012) 5–9.
- [30] L. Pena, B.K. Burton, Survey of health status and complications among propionic acidemia patients, *Am. J. Med. Genet. A* 158A (2012) 1641–1646.
- [31] A. Rivera-Barahona, A. Fulgencio-Covian, C. Perez-Cerda, R. Ramos, M.A. Barry, M. Ugarte, B. Perez, E. Richard, L.R. Desviat, Dysregulated miRNAs and their pathogenic implications for the neurometabolic disease propionic acidemia, *Sci Rep* 7 (2017) 5727.
- [32] J.D. Molkentin, J.R. Lu, C.L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S.R. Grant, E.N. Olson, A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy, *Cell* 93 (1998) 215–228.
- [33] Y.K. Tham, B.C. Bernardo, J.Y. Ooi, K.L. Weeks, J.R. McMullen, Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets, *Arch. Toxicol.* 89 (2015) 1401–1438.
- [34] V. Belcastro, V. Siciliano, F. Gregoret, P. Mithbaokar, G. Dharmalingam, S. Berlingieri, F. Iorio, G. Oliva, R. Polishchuck, N. Brunetti-Pierri, D. di Bernardo, Transcriptional gene network inference from a massive dataset elucidates transcriptome organization and gene function, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 8677–8688.
- [35] D. Graham, N.N. Huynh, C.A. Hamilton, E. Beattie, R.A. Smith, H.M. Cocheme, M.P. Murphy, A.F. Dominiczak, Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ10 improves endothelial function and attenuates cardiac hypertrophy, *Hypertension* 54 (2009) 322–328.
- [36] O. Firuzi, R. Miri, M. Tavakkoli, L. Saso, Antioxidant therapy: current status and future prospects, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 3871–3888.
- [37] H.H. Schmidt, R. Stocker, C. Vollbracht, G. Paulsen, D. Riley, A. Daiber, A. Cuadrado, Antioxidants in translational medicine, *Antioxid. Redox Signal.* 23 (2015) 1130–1143.
- [38] J. Gambini, M. Ingles, G. Olaso, R. Lopez-Gruoso, V. Bonet-Costa, L. Gimeno-Mallench, C. Mas-Bargues, K.M. Abdelaziz, M.C. Gomez-Cabrera, J. Vina, C. Borrás, Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans, *Oxidative Med. Cell. Longev.* (2015) 837042 2015.
- [39] M.R. de Oliveira, S.F. Nabavi, A. Manayi, M. Daglia, Z. Hajheydari, S.M. Nabavi, Resveratrol and the mitochondria: from triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view, *Biochim. Biophys. Acta* 1860 (2016) 727–745.
- [40] M.P. Murphy, Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage, *Biochem. Soc. Trans.* 44 (2016) 1219–1226.
- [41] R.A. Smith, C.M. Porteous, A.M. Gane, M.P. Murphy, Delivery of bioactive

- molecules to mitochondria in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 5407–5412.
- [42] H.J. Forman, K.J. Davies, F. Ursini, How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo, *Free Radic. Biol. Med.* 66 (2014) 24–35.
- [43] V.A. Rao, S.R. Klein, S.J. Bonar, J. Zielonka, N. Mizuno, J.S. Dickey, P.W. Keller, J. Joseph, B. Kalyanaraman, E. Shacter, The antioxidant transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy and growth arrest induced by the anticancer redox agent mitoquinone, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 34447–34459.
- [44] Y. Gonzalez, B. Aryal, L. Chehab, V.A. Rao, Atg7- and Keap1-dependent autophagy protects breast cancer cell lines against mitoquinone-induced oxidative stress, *Oncotarget* 5 (2014) 1526–1537.
- [45] A.T. Dinkova-Kostova, A.Y. Abramov, The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function, *Free Radic. Biol. Med.* 88 (2015) 179–188.
- [46] B.T. Tung, E. Rodriguez-Bies, M. Ballesteros-Simarro, V. Motilva, P. Navas, G. Lopez-Lluch, Modulation of endogenous antioxidant activity by resveratrol and exercise in mouse liver is age dependent, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 69 (2014) 398–409.
- [47] B.T. Tung, E. Rodriguez-Bies, H.N. Thanh, H. Le-Thi-Thu, P. Navas, V.M. Sanchez, G. Lopez-Lluch, Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice, *Aging Clin. Exp. Res.* 27 (2015) 775–783.
- [48] O.A. Shchelochkov, N. Carrillo, C. Venditti, Propionic acidemia, in: R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J.H. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J.H. Smith, K. Stephens (Eds.), *GeneReviews*(R), 1993 Seattle (WA).



Lab resource: Stem Cell Line

## Generation and characterization of a human iPSC line (UAMi004-A) from a patient with propionic acidemia due to defects in the *PCCB* gene



Arístides López-Márquez<sup>a</sup>, Esmeralda Alonso-Barroso<sup>a,b,c,d</sup>, Gema Cerro-Tello<sup>a</sup>, Irene Bravo-Alonso<sup>a,b,c,d</sup>, Laura Arribas-Carreira<sup>a,b,c,d</sup>, Álvaro Briso-Montiano<sup>a,b,c,d</sup>, Rosa Navarrete<sup>b,c,d</sup>, Celia Pérez-Cerdá<sup>b,c,d</sup>, Magdalena Ugarte<sup>b,c,d</sup>, Belén Pérez<sup>a,b,c,d</sup>, Lourdes R. Desviat<sup>a,b,c,d</sup>, Eva Richard<sup>a,b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), Madrid, Spain

<sup>c</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Paz (IdiPaz), ISCIII, Madrid, Spain

### ABSTRACT

A human induced pluripotent stem cell (iPSC) line was generated from fibroblasts of a patient with propionic acidemia that has a homozygous mutation (c.1218\_1231del14ins12 (p.G407 fs)) in the *PCCB* gene. Reprogramming factors *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* and *c-MYC* were delivered using a non-integrative method based on the Sendai virus. Once established, iPSCs have shown full pluripotency, differentiation capacity and genetic stability. The generated iPSC line represents a useful tool to study the pathomechanisms underlying the deficiency.

Resource table.		Inducible/constitutive system	Non applicable
Unique stem cell lines identifier	UAMi004-A	Date archived/stock date	March 2019
Alternative name of stem cell line	PCCB10-FIPS4F-1	Cell line repository/bank	Spanish National Bank of Cell Lines <a href="http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/fd-banco-nacional-lineas-celulares/fd-lineas-celulares-disponibles/lineas-de-celulas-iPSC.shtml">http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-organizacion/fd-estructura-directiva/fd-subdireccion-general-investigacion-terapia-celular-medicina-regenerativa/fd-centros-unidades/fd-banco-nacional-lineas-celulares/fd-lineas-celulares-disponibles/lineas-de-celulas-iPSC.shtml</a>
Institution	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, CIBERER, IDIPaz, Madrid, Spain.	Ethical approval	Patient informed consent obtained. Ethics Review Board-competent authority approval obtained (CEI 71-1278)
Contact information of distributor	Eva Richard, <a href="mailto:erichard@cbm.csic.es">erichard@cbm.csic.es</a>		
Type of cell line	iPSC		
Origin	Human		
Additional origin info	Age: 30 Sex: Female Ethnicity if known: Caucasian		
Cell Source	Fibroblasts		
Clonality	Clonal		
Method of reprogramming	Sendai Virus		
Genetic modification	Yes		
Type of modification	Hereditary		
Associated disease	Propionic acidemia		
Gene/locus	<i>PCCB</i> / 3q22		
Method of modification	Non applicable		
Name of transgene or resistance	Non applicable		

### 1. Resource utility

The pathophysiology of propionic acidemia is not completely understood and its treatment currently is not satisfactory. In order to investigate underlying cellular pathological mechanisms and to test potential therapeutic compounds, we have established an iPSC line with a homozygous mutation in the *PCCB* gene.

### 2. Resource details

Propionic acidemia (PA, MIM#606054, ORPHA:35) is one of the most frequent life-threatening organic acidemias, caused by mutations

\* Corresponding author at: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC, Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma Madrid, 28049 Madrid, Spain.  
E-mail address: [erichard@cbm.csic.es](mailto:erichard@cbm.csic.es) (E. Richard).

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101469>

Received 23 April 2019; Received in revised form 16 May 2019; Accepted 20 May 2019

Available online 22 May 2019

1873-5061/ © 2019 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

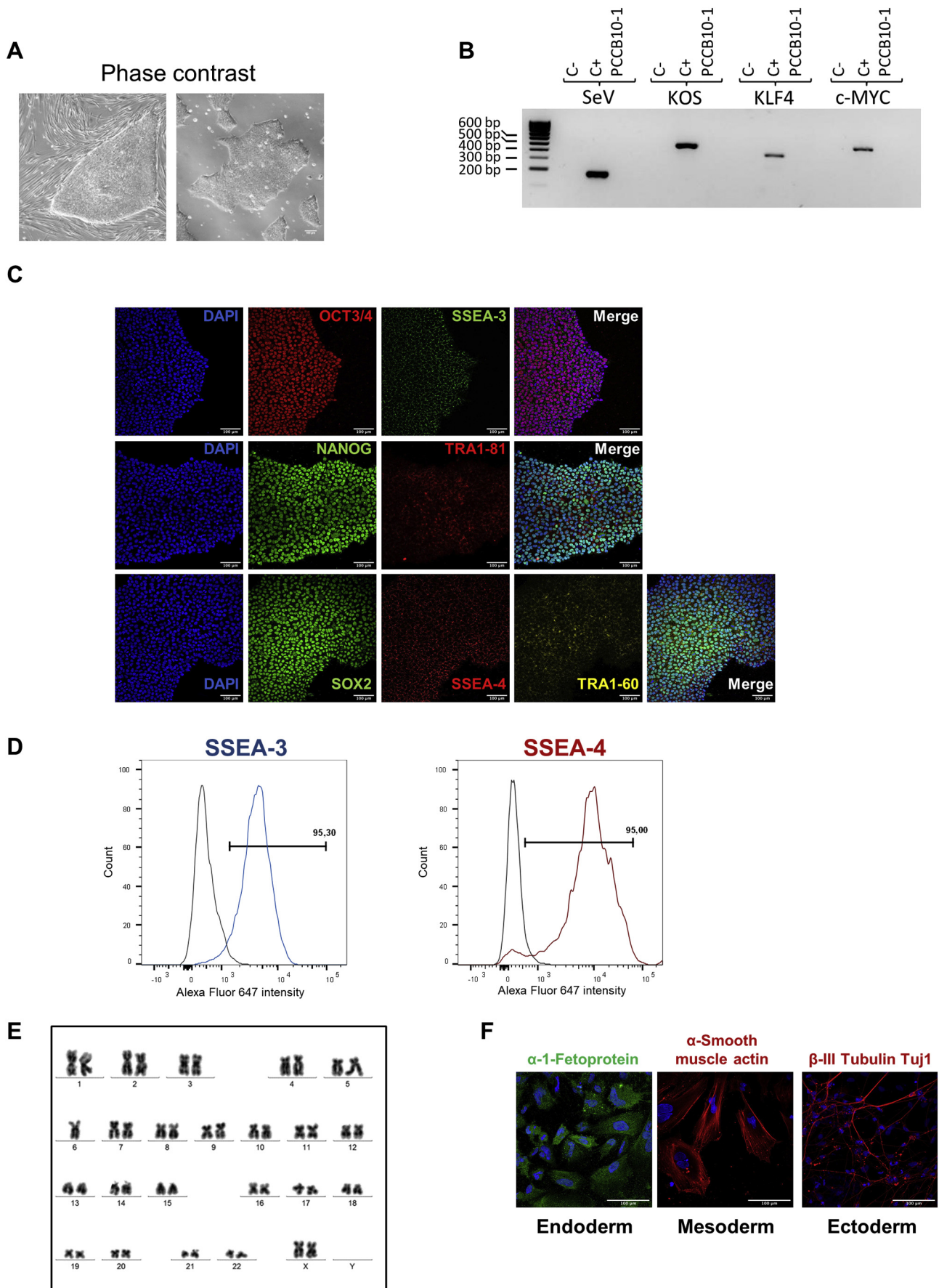


Fig. 1. Characterization of the iPSC line PCCB10-FiPS4F1 (UAMi004-A).

in either the *PCCA* or *PCCB* genes, encoding both subunits of the mitochondrial propionyl-CoA carboxylase (PCC) enzyme, that catalyzes the carboxylation of propionyl-CoA to D-methylmalonyl-CoA, which eventually enters the Krebs cycle as succinyl-CoA (Richard et al., 2015). Fibroblasts from a homozygous PA patient carrying the previously described c.1218\_1231del14ins12 (p.G407 fs) mutation in the *PCCB* gene (Tahara et al., 1990) were reprogrammed using the CytoTune™ iPS Reprogramming kit delivering the four human reprogramming factors *OCT3/4*, *SOX2*, *c-MYC* and *KLF4* (Takahashi et al., 2007). The iPSC line PCCB10-FiPS4F1 (UAMi004-A) (PCCB10–1 in figures for short) displayed a typical round shape ESC-like morphology and growth behaviour on feeder layers and on feeder-free layers (Fig. 1A, Table 1). Clearance of the vectors and of the exogenous reprogramming factor genes was observed by RT-PCR after 8 culture passages (Fig. 1B). Expression of key pluripotency genes was observed at protein level by immunocytochemistry (transcription factors OCT4, NANOG and SOX2, and surface markers SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81) (Fig. 1C, Table 1) and flow cytometry analysis (Fig. 1D, Table 1). The iPSC line displayed a normal karyotype (46, XX) after more than twenty culture passages (Fig. 1E). The cells had the capacity to form derivatives of all three germ layers (endoderm, mesoderm and ectoderm) upon embryoid body differentiation (Fig. 1F, Table 1). Mycoplasma testing by PCR revealed a negative result (Supplementary Fig. S1A). We confirmed the presence of the mutation in the iPSC line in homozygous fashion by Sanger sequencing (Supplementary Fig. S1B); and we also confirmed by DNA fingerprinting analysis that the line was derived from the patient fibroblasts.

### 3. Materials and methods

#### 3.1. Non-integrative reprogramming of mutant *PCCB* fibroblasts into iPSC

The present study included available fibroblasts from a PA patient with defects in the *PCCB* gene. Experimental protocols were approved by the Institutional Ethical Committee of the Universidad Autónoma de Madrid according to Spanish and European Union legislation, and the informed consent was obtained from the legal care-givers. Fibroblasts were reprogrammed using the CytoTune™ iPS Reprogramming kit (ThermoFisher Scientific) following the manufacturer's instructions. iPSCs were maintained and expanded both on feeder layers and on feeder-free layers as previously described (Alonso-Barroso et al., 2017).

#### 3.2. Detection of Sendai virus genome and transgenes

After 8 passages, iPSC line was tested for Sendai virus (SeV) residues as described (Alonso-Barroso et al., 2017). PCR was performed using the primers indicated in Table 2 and following the instructions as

recommended by the manufacturer. In Fig. 1 panel B: C+: transduced cell pool at passage zero; C–: non-template control.

#### 3.3. Immunofluorescence analysis

iPSC were grown on feeder-free layers on 15  $\mu$ -Slide 8 well culture plates (Ibidi) and fixed with Formaline Solution 10% (Sigma-Aldrich). Immunofluorescence analysis was performed as previously described (Alonso-Barroso et al., 2017). In Fig. 1 scale bars: 100  $\mu$ m.

#### 3.4. Flow cytometry analysis

We analysed the pluripotency-associated markers SSEA-3 and SSEA-4 by flow cytometry as described (Alonso-Barroso et al., 2017). Unstained iPSCs and the corresponding isotype antibodies were used as negative controls to exclude data from non-specific fluorescence.

#### 3.5. In vitro differentiation

iPSCs were detached with Accutase™ into a single cell suspension and resuspended in mTESR™1 medium (StemCell™ Technologies) with 10  $\mu$ M Rock inhibitor (StemCell™ Technologies). Embryoid body formation was induced by seeding 20,000–30,000 iPSC cells in 120  $\mu$ l of mTESR™1 medium in each well of 96-well v-bottom, low attachment plates (Deltalab). *In vitro* differentiation was performed as described (Alonso-Barroso et al., 2017).

#### 3.6. Mycoplasma detection

Cells were screened for mycoplasma contamination by PCR (Uphoff & Drexler, 2014). A positive sample with mycoplasma was used as a control. In Supplementary Fig. S1A: positive control (C+).

#### 3.7. Mutation analysis

Genomic DNA from patient-derived fibroblasts and iPSCs was isolated using MagNA Pure Compact DNA Isolation kit and MagNA Pure Compact instrument (Roche). Subsequently, amplification by PCR of the *PCCB* region containing the mutation was carried out using the primers indicated in Table 2, FastStart Taq DNA Polymerase (Roche), the Veriti Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific) and the PCR program: 94 °C 5 min; 94 °C 25 s, 55 °C 25 s and 72 °C 40 s for 38 cycles; and 72 °C 7 min. Amplified PCR fragments were sequenced in an ABI3730 sequencer (Applied Biosystems).

**Table 1**  
Characterization and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology	Photography	Normal	Fig. 1 panel A
Phenotype	Qualitative analysis (Immunocytochemistry)	Positive for: OCT4, NANOG, SOX2, SSEA-3, TRA-1-81, SSEA-4 and TRA-1-60	Fig. 1 panel C
	Quantitative analysis (Flow cytometry)	SSEA-3 and SSEA-4: 95%	Fig. 1 panel D
	Karyotype (G-banding) and resolution	46XX Resolution 450–500	Fig. 1 panel E
Identity	STR analysis	16 sites tested and all of them matched	Available with the authors
Mutation analysis (IF APPLICABLE)	Sequencing	c.1218_1231del14ins12 (p.G407fs)	Supplementary Fig. S1 panel B
Microbiology and virology	Southern Blot OR WGS	Not performed	
	Mycoplasma	Mycoplasma testing by PCR: negative	Supplementary Fig. S1 panel A
Differentiation potential	Embryoid body formation	Expression of $\alpha$ -1-fetoprotein (endoderm), $\alpha$ -smooth muscle actin (mesoderm) and $\beta$ -III-tubulin Tuj1 (ectoderm)	Fig. 1 panel F
Donor screening (OPTIONAL)	HIV 1 + 2 Hepatitis B, Hepatitis C	Not performed	No
Genotype additional info (OPTIONAL)	Blood group genotyping	Not performed	No
	HLA tissue typing	Not performed	No



**Table 2**  
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-cytometry			
	Antibody	Dilution	Company Cat # and RRID
Pluripotency Markers	Mouse IgG anti-OCT4	1:60	Santa Cruz Cat# sc-5279, AB_628051
	Rat IgM anti-SSEA-3	1:3	Hybridoma Bank Cat# MC-631, AB_528476
	Rabbit IgG anti-SOX2	1:100	Fisher Thermo Scientific Cat# PA1-16968, AB_2195781
	Mouse IgG anti-SSEA-4	1:3	Hybridoma Bank Cat# MC-813-70, AB_528477
	Mouse IgM anti-TRA-1-60	1:200	Millipore Cat# MAB4360, AB_2119183
	Goat IgG anti-NANOG human	1:25	R&D Cat# AF1997, AB_355097
Differentiation Markers	Mouse IgM anti-TRA-1-81	1:200	Millipore Cat# MAB4381, AB_177638
	Rabbit IgG anti- $\alpha$ -Fetoprotein	1:400	Dako Cat# A0008, AB_2650473
	Mouse IgG anti- $\beta$ -III-Tubulin Tuj1	1:500	Covance Cat# MMS-435P, AB_231377
	Mouse IgG anti- $\alpha$ -smooth muscle actin	1:400	Sigma-Aldrich Cat# A5228, AB_262054
Secondary antibodies	Alexa 555 Donkey anti-Mouse IgG	1:200	Thermo Fischer Cat# A-31570, AB_2536180
	Alexa 488 Goat anti-Rat IgM	1:200	Thermo Fischer Cat#A-21212, AB_2535798
	Alexa 488 Donkey anti-Rabbit IgG	1:200	Thermo Fischer Cat# A-31572, AB_162543
	Alexa 555 Donkey anti-Mouse IgG	1:200	Thermo Fischer Cat# A-31570, AB_2536180
	Alexa 647 Goat anti-Mouse IgM	1:200	Thermo Fischer Cat# A-21238, AB_2535807
	Alexa 647 Donkey anti-Goat IgG	1:200	Thermo Fischer Cat# A-21447, AB_2535864
	Cy3 Donkey anti-Mouse IgM	1:200	Jackson Cat# 715-165-140, AB_2340812
	Alexa 647 Goat anti-mouse IgG	1:600	Thermo Fischer Cat# A- 21235, AB_2535804
Alexa 647 Donkey anti-rat IgM	1:600	Thermo Fischer Cat# A-21248, AB_2535816	
Primers			
	Target	Forward/Reverse primer (5'-3')	
Reverse Transcription-PCR	<i>SeV</i> genome (181 pb)	GGATCACTAGGTGATATCGAGC/ ACCAGACAAGAGTTAAGATATGTATC	
	<i>KOS</i> transgene (528 bp)	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC/ ACCTTGACAATCCTGATGTGG	
	<i>KLF4</i> transgene (410 bp)	TTCTGTCATGCCAGAGGAGCC/ AATGTATCGAAGGTGCTCAA	
	<i>c-MYC</i> transgene (532 bp)	TAACCTGACTAGCAGGCTTGTCG/ TCCACATACAGTCTGGATGATGATG	
Targeted mutation analysis/sequencing (PCR)	<i>PCCB-exons 11 and 12</i> (601 bp)	GGATGGCTGCTGAGGACAAA/TCCACCACGGCTATGCTGTAG	
Mycoplasma detection (PCR)	Mycoplasma species (986 bp: internal control band; and 520 bp: mycoplasma specific band)	Forward primers: CGCCTGAGTACGTTCGC CGCCTGAGTACGTACGC TGCCTGGGTAGTACATTCCG TGCCTGAGTAGTACATTCCG CGCCTGAGTAGTATGCTCGC CACCTGAGTAGTATGCTCGC CGCCTGGGTAGTACATTCCG Reverse primers: GCGGTGTGTACAAGACCCGA GCGGTGTGTACAAAACCCGA GCGGTGTGTACAACCCCGA	

### 3.8. Karyotype analysis

Karyotype analysis of the iPSC line was carried out using cells with more than twenty culture passages which were processed using standard cytogenetic techniques as described (Alonso-Barroso et al., 2017). At least 35 metaphases were karyotyped.

### 3.9. DNA fingerprinting analysis

DNA fingerprinting analysis was performed as previously described (Alonso-Barroso et al., 2017).

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101469>.

### Acknowledgments

Research reported in this work was funded by Grant PAF107 from the Propionic Acidemia Foundation and by grant SAF2016-76004-R from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and European Regional Development Fund. The authors thank INDEPF (Instituto de investigación y desarrollo social de enfermedades poco frecuentes), the Cytogenetic unit from Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

(CNIO) and Mar Álvarez for their excellent technical assistance. *Centro de Biología Molecular Severo Ochoa* receives an institutional grant from *Fundación Ramón Areces*. ALM is a postdoctoral researcher of Comunidad Autónoma de Madrid (PEJD-2017-POST/BMD-3671). EAB is a PhD student funded by the FPU program of the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (FPU15/02923).

### References

- Alonso-Barroso, E., Brasil, S., Briso-Montiano, A., Navarrete, R., Perez-Cerda, C., Ugarte, M., Perez, B., Desviat, L.R., Richard, E., 2017. Generation and characterization of a human iPSC line from a patient with propionic acidemia due to defects in the PCCA gene. *Stem Cell Res.* 23, 173–177.
- Richard, E., Perez, B., Perez-Cerda, C., Desviat, L.R., 2015. Understanding molecular mechanisms in propionic acidemia and investigated therapeutic strategies. *Expert Opin on Orphan Drugs* 3, 1427–1438.
- Tahara, T., Kraus, J.P., Rosenberg, L.E., 1990. An unusual insertion/deletion in the gene encoding the  $\beta$ -subunit of propionyl-CoA carboxylase is a frequent mutation in Caucasian propionic acidemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1372–1376.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Uphoff, C.C., Drexler, H.G., 2014. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures. *Curr Protoc Mol Biol* 106, 28.4.1–28.4.14.

# Pathogenic implications of dysregulated miRNAs in propionic acidemia related cardiomyopathy



ALEJANDRO FULGENCIO-COVIÁN, ESMERALDA ALONSO-BARROSO, ADAM J. GUENZEL, ANA RIVERA-BARAHONA, MAGDALENA UGARTE, BELÉN PÉREZ, MICHAEL A. BARRY, CELIA PÉREZ-CERDÁ, EVA RICHARD, and LOURDES R. DESVIAT

MADRID, SPAIN; AND ROCHESTER, MINNESOTA

Cardiac alterations (hypertrophic/dilated cardiomyopathy, and rhythm alterations) are one of the major causes of mortality and morbidity in propionic acidemia (PA), caused by the deficiency of the mitochondrial enzyme propionyl-CoA carboxylase (PCC), involved in the catabolism of branched-chain amino acids, cholesterol, and odd-chain fatty acids. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation has been documented in heart biopsies of PA patients, as well as in the hypomorphic *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mouse model, in the latter correlating with increased oxidative damage and elevated expression of cardiac dysfunction biomarkers atrial and brain natriuretic peptides (ANP and BNP) and beta-myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC). Here we characterize the cardiac phenotype in the PA mouse model by histological and echocardiography studies and identify a series of upregulated cardiac-enriched microRNAs (miRNAs) in the PA mouse heart, some of them also altered as circulating miRNAs in PA patients' plasma samples. In PA mice hearts, we show alterations in signaling pathways regulated by the identified miRNAs, which could be contributing to cardiac remodeling and dysfunction; notably, an activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway and a decrease in autophagy, which are reverted by rapamycin treatment. In vitro studies in HL-1 cardiomyocytes indicate that propionate, the major toxic metabolite accumulating in the disease, triggers the increase in expression levels of miRNAs, BNP, and  $\beta$ -MHC, concomitant with an increase in reactive oxygen species. Our results highlight miRNAs and signaling alterations in the PCC-deficient heart which may contribute to the development of PA-associated cardiomyopathy and provide a basis to identify new targets for therapeutic intervention. (Translational Research 2020; 218:43–56)

**Abbreviations:** ANP = atrial natriuretic peptide;  $\beta$ -MHC = beta-myosin heavy chain; BNP = brain natriuretic peptide; CardiomiRs = cardiac enriched miRNAs; Ct = cycle threshold; DCM = dilated cardiomyopathy; EF = ejection fraction; FS = fractional shortening; GSK3 = glycogen synthase kinase 3; HCM = hypertrophic cardiomyopathy; IGF-1 = insulin-like growth factor 1; i.p. = intra peritoneal; IVRT = isovolumetric relaxation time; LV = left ventricle; LVID = left

From the Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), Madrid, Spain; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain; Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Paz (IdiPaz), ISCIII, Madrid, Spain; Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. Submitted for Publication September 20, 2019; received submitted December 3, 2019; accepted for publication December 23, 2019.

Reprint requests: Lourdes R. Desviat, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, C/Nicolás Cabrera 1 Cantoblanco (Campus UAM), 28049 Madrid, Spain. E-mail address: [lruiz@cbm.csic.es](mailto:lruiz@cbm.csic.es).

1931-5244/\$ - see front matter

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.12.004>

ventricle internal diameter; miRNA = microRNA; mTOR = mammalian target of rapamycin; MV = mitral valve; PA = propionic acidemia; PCC = propionyl-CoA carboxylase; PI3K/AKT = phosphatidylinositol 3 kinase-protein kinase B; ROS = reactive oxygen species; TEM = transmission electron microscopy; wt = wild-type

## AT A GLANCE COMMENTARY

Fulgencio-Covián, A et al.

### Background

This is a follow-up study following an initial work investigating the involvement of miRNAs in the neurometabolic disease propionic acidemia (PA), frequently associated with life-threatening cardiomyopathies. In this work we analyze cardiac-enriched miRNAs (cardiomiRs) and their regulated pathways (PI3K/AKT, mTOR, and autophagy) in heart tissue of the mouse model of PA and circulating levels of these cardiomiRs in PA patients' plasma samples. In vitro studies with propionate provide insight into potential mechanisms triggering miRNA dysregulation.

### Translational Significance

The dysregulation of cardiomiRs in the mouse model and in PA patients reveals their potential as disease biomarkers involved in cardiac pathophysiology. In addition, our results provide a basis for the development of specific therapies targeting dysregulated miRNAs or altered cellular processes identified in this work.

## INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that regulate gene expression through translational repression or transcript degradation via binding to complementary sequences in the 3'-UTR of target mRNAs. To date, evidence has accumulated identifying miRNA networks that govern most biological processes and signaling pathways in response to different stimuli.<sup>1</sup> Therefore, miRNA dysregulation negatively affects cellular physiology and contributes to disease development. Alterations in miRNA function have been reported in many human disorders including cancer, cardiovascular, neurodegenerative, and metabolic diseases.<sup>2</sup> In addition to their role as critical contributors to cellular pathophysiology, the discovery of the stable presence of miRNAs in body fluids in relation to disease has laid the foundations for their clinical use as minimal invasive biomarkers for diagnosis, prognosis or treatment monitoring.<sup>3</sup>

In inherited metabolic diseases different reports have described an altered miRNA profile in animal models and in patients' samples.<sup>2</sup> Plasma miRNA levels as biomarkers for disease and treatment response have been described,<sup>4</sup> as well as modulation of miRNA levels as therapeutic approach.<sup>5</sup> In propionic acidemia (PA, MIM#606054), one of the most frequent life-threatening organic acidemias, caused by a defect in the mitochondrial enzyme propionyl-CoA carboxylase (PCC, E.C.6.4.1.3), we recently identified a set of altered miRNAs in liver of the hypomorphic mouse model *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T).<sup>6</sup> Three of them, miR-34a, miR-338, and miR-350 were found upregulated in brain and heart tissue and the first 2 were also detected in altered levels in PA patients' plasma, underlying their possible contribution to disease pathophysiology and their potential as disease biomarkers.<sup>6</sup>

PA results from mutations in either the *PCCA* or *PCCB* genes, encoding both subunits of the PCC enzyme, and is characterized by the toxic accumulation of propionyl-CoA and derived metabolites. This produces a secondary mitochondrial dysfunction, an energetic defect and cellular oxidative damage.<sup>7</sup> PA usually presents neonatally as a toxic encephalopathy although there are milder late-onset forms. Advances in supportive treatment based on protein restriction and carnitine supplementation have allowed patients to live beyond the neonatal period. However, the overall outcome remains poor in most patients, who suffer from numerous complications related to disease progression, among them cardiac alterations (arrhythmias, dilated cardiomyopathy [DCM] or hypertrophic cardiomyopathy), a major cause of PA morbidity and mortality.<sup>8,9</sup> The hypomorphic PA mouse model mimics the biochemical and clinical signs of the disease. It exhibits elevated expression of *Nppa*, *Nppb*, and *Myh7*, encoding atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC), respectively, biomarkers of cardiac dysfunction.<sup>6,10</sup> Recently, using this model we have demonstrated the potential role of impaired Ca<sup>2+</sup> handling in arrhythmias and cardiac dysfunction in PA.<sup>11</sup>

Given these observations, in this study we have characterized the cardiac phenotype by histological and echocardiography studies in hypomorphic PA mice and analyzed levels of cardiac enriched miRNAs (cardiomiRs), their target genes and regulated signaling pathways. Evidence of the clinical relevance of these findings was provided by the analysis of these

cardiomiRs in PA patients' plasma samples. The results provide new insights into miRNA-mediated altered cellular processes involved in the development of PA-associated cardiomyopathy.

## MATERIAL AND METHODS

**Mice handling.** All mice used, wild-type (wt) and hypomorphic *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T), were adults (5–8 month-old) in an FVB (susceptible to Friend leukemia virus B) background.<sup>10</sup> Both males and females were included in all experiments except in the echocardiographic analysis, in which only males were studied. Mice were maintained on standard chow. All the experiments were carried out in a pathogen-free environment at the Animal Facility of Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, in accordance with the Spanish Law of Animal Protection. The Institutional Animal Experimentation Ethical Committee (Universidad Autónoma de Madrid, reference CEI 963-A026) and the Regional Environment Department (Comunidad de Madrid, reference PROEX 22/14) approved all animal experiments. Genomic DNA isolated from tail biopsies was used for animal genotyping, as previously described.<sup>10</sup>

**Mice echocardiography.** Transthoracic echocardiography was blinded performed by an expert operator in the CNIC Imaging facility (<https://www.cnic.es/en/investigacion/imaging>) using a high-frequency ultrasound system (Vevo 2100, Visualsonics Inc., Canada) with a 40-MHz linear probe. Two-dimensional and M-mode echography were performed at a frame rate above 230 frames/sec, and pulse wave Doppler was acquired with a pulse repetition frequency of 40 kHz. Mice were lightly anesthetized with 1–2% isoflurane in oxygen, adjusting the isoflurane delivery trying to maintain the heart rate in 450±50 bpm. Mice were placed in supine position using a heating platform and warmed ultrasound gel was used to maintain normothermia. A base apex electrocardiogram was continuously monitored. Images were transferred to a computer and were analyzed off-line using the Vevo 2100 Workstation software.

For left ventricular (LV) systolic function assessment, parasternal standard two-dimensional and M-mode, long and short axis views (LAX and SAX view, respectively) were acquired. LV ejection fraction, LV fractional shortening, and LV chamber dimensions were calculated from these views.<sup>12</sup> Mitral valve inflow pattern was acquired using pulse wave Doppler echography in the 4-chamber apical view to assess diastolic function. The sample volume was positioned parallel to the blood flow, across the mitral orifice. Early and

late diastolic velocity peak wave (E and A, respectively), the E/A ratio and isovolumetric relaxation time were measured.<sup>13</sup>

**Transmission electron microscopy.** Cardiac tissue was collected immediately after mice were euthanized by exsanguination and placed in Trump's fixative (1% glutaraldehyde/4% formalin in 0.1 M phosphate buffer), postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol, and embedded in Spurr epoxy resin. The tissue was sectioned at 800 angstroms, placed onto copper grids and stained with lead citrate. Sections were viewed using a model 1400 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 80 KeV.

**Rapamycin treatment.** Rapamycin (LC laboratories, Boston, Mass) was dissolved in ethanol at 20 mg/mL and diluted in a solution buffer of 90% PBS, 5% PEG 400, 5% Tween 80. Five month-old wt and PA mice were injected intraperitoneally every day for a week with 2 mg/kg of rapamycin. After 7 days of treatment, mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation and hearts were excised, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –70°C until use.

**Human samples.** Human plasma samples were used for miRNA analysis. PA patients' plasma was remnants of samples referred to the laboratory for follow-up with the appropriate informed consent. Nine were from *PCCB* deficient patients and one from a *PCCA* deficient patient (Table I). All the samples were taken during periods of metabolic stability of the patients and time after being diagnosed with DCM or Long Qt, except for P5, who was diagnosed with emerging DCM at the time of plasma sampling. Matched control plasma samples were obtained from Sera Lab Ltd. (<http://www.seralab.co.uk/>), collected from consented anonymous donors. The Ethical Committee (Universidad Autónoma de Madrid) approved this study. All human experimental methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

**Cell culture and propionate treatment.** HL-1 cardiomyocytes were cultured in Claycomb medium (Sigma, Saint Louis, Mo), supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine 20 mM, and a cocktail of antibiotics. To ensure proper growth of the cells, 0.3 M ascorbic acid (Sigma), 1 mM retinoic acid (Sigma) and 5 mg/mL insulin (Sigma) were added to the medium. Before cell seeding, plates were treated for 24 hours with 0.1% gelatin and 25 µg of fibronectin (Sigma). Three days before propionate treatment, cells were seeded in P6 plates (~200,000 cells per well). Then, 5 mM of sodium propionate (Sigma) was added to the medium and refreshed at 48 hours. Cells were collected for mRNA and miRNA analysis and reactive oxygen species (ROS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) quantification 4 or 8 days after

**Table I.** Biochemical and genetic data and cardiac phenotype of PA patients included in the circulating miRNA analysis

Pat.	Sex	Age at diagnosis	Plasma ( $\mu\text{mol/L}$ )		Urine (mmol/mol creat)			Genotype	Actual age	Cardiac phenotype	Comments
			C3 NV < 0,89	Gly NV <293	3OHP NV <30	PG NV: ND	MC NV <13				
P1	F	14 d Metabolic ketoacidosis, hyperammonemia	51	691	955	122	907	PCCB: c.494G>A + c.1218_1231del14ins12	30 y	Long Qt at 14 y	No cardiac phenotype at last follow-up
P2	F	1 d Ketosis, mild hyperammonemia	59	1072	441	721	681	PCCB: c.1218_1231del14ins12 + c.1218_1231del14ins12	30 y	DCM since infancy	Treated with digoxine
P3	F	1 m 22 d Metabolic ketoacidosis	23	-	148	33	5909	PCCB: c.502G>A + c.502G>A	21 y	Normal at 16 y	No recent cardiac examination
P4	F	6 y 3 m Metabolic acidosis	22	-	372	189	907	PCCA: c.1846-2_1852del + c.229C>T	38 y	Normal	-
P5	M	1 y 10 m Metabolic ketoacidosis	31,3	-	72	4	364	PCCB: c.502G>A + c.1173dupT	23 y	Emerging DCM	DCM just detected
P6	M	3 y 1 m Metabolic ketoacidosis	25	1010	514	756	1295	PCCB: c.502G>A + c.1218_1231del14ins12	17 y	Long Qt	No clinical impact
P7	M	2 m 2 d Metabolic acidosis	40	922	204	13	724	PCCB: c.737G>A + c.737G>A	20 y	Normal	-
P8	F	11 y 5 d Ketosis. Chickenpox.	23	-	184	10	220	PCCB: c.683C>T + c.1218_1231del14ins12	14 y	Long Qt	Twin of P10
P9	F	25 y 5 m No metabolic disturbances	8	-	125	14	178	PCCB: c.683C>T + c.1218_1231del14ins12	28 y	Long Qt	Sister of P8 & P10
P10	M	11 y 7 m No metabolic disturbances.	11	-	94	11	329	PCCB: c.683C>T + c.1218_1231del14ins12	14 y	Long Qt	Twin of P8

Abbreviations: C3, propionylcarnitine; Creat, creatinine; DCM, dilated cardiomyopathy; d, days; F, Female; Gly, glycine; 3OHP, 3-hydroxypropionic acid; M, male; m, months; MC, methylcitric acid; ND, not detectable; NV, normal value; pat (P), patient; PG, propionylglycine; y, years.

Most patients were diagnosed when a metabolic crisis occurred presenting the typical PA organic aciduria.

initiation of treatment. To determine ROS production by flow cytometry, cells were detached by trypsinization and cellular fluorescence intensity was measured after 30 minutes incubation at 37°C with the H<sub>2</sub>DCFDA probe in the FACS Canto II (Becton Dickinson Biosciences). Data analysis was performed using FlowJo program.

**RNA and protein extraction.** For RNA extraction, both tissue and cell (HL-1 cardiomyocytes) samples were treated for 20 minutes with lysis buffer (supplied by Qiagen) and proteinase K. Then, total RNA was extracted using miRNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. Concentration and integrity of total RNA was measured in the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc, Rockland, Del). RNA isolation from human plasma samples was performed using miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (QIAGEN), following the manufacturer's instructions. 200  $\mu$ L of plasma were used and RNA was eluted in 20  $\mu$ L.

Protein samples were obtained from HL-1 cells and from frozen mouse heart tissue. HL-1 cells were harvested by trypsinization and treated with lysis buffer (10 mM Tris-HCl 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Triton, and 10% glycerol), protease and phosphatase inhibitors. Samples were subjected to freeze-thawing cycles and proteins were collected in the supernatant fraction after centrifugation of the cell lysates. Mouse heart tissue was pulverized using screws cooled in liquid N<sub>2</sub> and proteins were isolated by disrupting the powdered tissue in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA, and 10% glycerol) using TissueLyser (2 rounds of 90 seconds at 20 Hz) followed by centrifugation at 10,000 *g* for 30 minutes at 4°C. Protein concentration in the supernatant was measured using the Bradford method (Bio-Rad Laboratories).

**miRNA analysis.** A total of 5 ng RNA was obtained from heart tissue or HL-1 cells and 4  $\mu$ L of the RNA eluate from plasma samples were used for retrotranscription using the miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN). miRNAs were amplified using specific LNA primers and miRCURY LNA SYBR Green PCR kit (QIAGEN), in a LightCycler 480 instrument (Roche Applied Biosciences, In), according to the manufacturer's instructions. For tissue and cellular samples, miR-423-3p and snRNA U6 were used as endogenous controls; for plasma samples, miR-103a-3p was used for normalization. Relative miRNA expression was quantified using the comparative threshold method after the detection of the different Ct values for the reference miRNA and the target ones, using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. All samples were run in triplicate.

**mRNA quantification.** For gene expression analysis, cDNA was obtained by retrotranscription of 500 ng of

total RNA from mouse heart samples or HL-1 cells using NZY First-Strand cDNA synthesis kit (NZY-Tech, Lda, Lisbon, Portugal). *Nppa* (ANP), *Nppb* (BNP), *Myh7* ( $\beta$ -MHC), *Col1a1* (COL1A1), *Col1a2* (COL1A2), *Col3a1* (COL3A1), and *Med13* (THRAP1) genes were amplified with specific primers (available upon request) using Perfecta SYBR Green FastMix kit (Quanta Biosciences, Beverly, Mass) in a LightCycler480 II instrument (Roche Applied Biosciences). *Gapdh* was used as endogenous control and quantification was done using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

**Phosphatidylinositol 3 kinase-protein kinase B signaling pathway expression profiling.** Total RNA (100 ng/ $\mu$ L) from wt and PA mouse heart tissue was reversed transcribed using NZY First-Strand cDNA synthesis kit (NZYTech, Lda, Lisbon, Portugal). cDNA samples were pooled in 4 control and 4 PA groups. mRNA profiling was performed with Mouse phosphatidylinositol 3 kinase-protein kinase B (PI3K-AKT) Signaling Pathway RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (QIAGEN), which contains mouse specific primers for 84 genes involved in the PI3K-AKT pathway. Real-time PCR amplification was performed with Perfecta SYBR Green FastMix (Quanta Biosciences) in an ABI 7900HT instrument (Applied Biosystems, Calif). The ABI software was used to obtain raw threshold cycle value for each mRNA. qRT-PCR reactions and analysis were carried out at Genomics Core Facility, Parque Científico de Madrid, Spain. Relative quantification or fold change for each mRNA was calculating with the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, using 5 housekeeping genes (*Gapdh*, *B2m*, *Actb*, *Ywhah*, and *Gusb*) as internal controls.

**Western blotting.** For western blot analysis, equal amounts of protein (50–75  $\mu$ g) were loaded into 10% or 12% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred into a nitrocellulose membrane using the iBlot Dry Blotting System. For the analysis of total and phosphorylated proteins, membranes were blocked for 1 hour with 5% nonfat milk or 3% bovine serum albumin, respectively, in 0.1% TBS-tween and incubated overnight with the corresponding primary antibody: LC3B (1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, Mass), caspase 3, caspase 9, LAMP1, Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389), p70 S6 Kinase, S6 Ribosomal Protein, Phospho-4E-BP1 (Ser65), Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244), 4E-BP1 (all of them used at 1:1,000, Cell Signaling Technology, Danvers, Mass) and p62/SQSTM1 (2C11) (1:5,000, Abnova-novus biologicals). Secondary antibodies were goat anti-rabbit and goat anti mouse (1:5,000 or 1:10,000, respectively, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif). Antibody against GAPDH was used as loading control (1:5,000, Abcam, Cambridge, UK). Enhanced chemiluminescence reagent (ECL, GE Healthcare) was used

for protein detection. Band intensity for each protein was quantified with BioRad GS-900 Densitometer (BioRad) and ImageLab program.

**Bioinformatics tools.** miRNA function, their targets and their expression profile were analyzed using miR-Walk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), TargetScan database ([http://www.targets.can.org/vert\\_72/](http://www.targets.can.org/vert_72/)) and Human miRNA Tissue Atlas (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas/>).

**Statistical analysis.** Data were presented as mean  $\pm$  SD. To analyze significant differences, the distribution of 2 groups was compared using 2-tailed unpaired *t*-test distribution; 3 or more groups were compared using ANOVA method followed by the Tukey's honestly significant difference or Games Howell post hoc test. P values below 0.05 were considered statistically significant: \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

## RESULTS

**Echocardiographic and biochemical studies.** In order to characterize the cardiac phenotype of the hypomorphic PA mouse model, we performed echocardiographic studies in wt and *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) male mice (n = 6 wt group and n = 7 PA group) at 5 and 8 months of age. Longitudinal echocardiographic analyses revealed cardiac alterations characterized by signs suggestive of diastolic dysfunction (Table II). The diastolic interventricular septal thickness was increased in PA mice compared with that of control mice. Diastolic left ventricular posterior wall thickness was also significantly increased in hypomorphic 5 month-old mice compared with wt mice. No differences were found in the analysis of the left ventricular mass (LV mass). E/A ratio, a clinical marker of diastolic dysfunction, was slightly increased in PA mice at 5 (35% increase) and 8 (20% increase) months of age as compared to wt (Table II) not reaching statistical significance. In addition, PA mice had an elevation in left ventricle internal diameter at end-diastole at both ages, indicating LV chamber dilation and DCM. We observed a reduction in the ejection fraction and fractional shortening parameters in 8 month-old PA mice compared to wt although not reaching statistical significance (Table II). Heart rates were similar between wt and PA mice.

Further to functional abnormalities, PA mice also displayed elevated gene expression of the fibrosis markers *Col1a1* and *Col3a1* at 5 months of age (Supplementary Figure 1). The expression of *Nppa*, *Nppb*, and *Myh7*, coding for cardiac damage markers ANP, BNP, and  $\beta$ -MHC, is elevated at this time point,<sup>6,10</sup> with no statistically significant changes detected at earlier (2 months) or later (10 months) ages (data not shown).

**Table II.** Echocardiographic characteristics of wild-type and *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) mice at different ages (M-Mode long axis)

Groupname	Age (months)	IVS;d(mm)	IVP;w;d (mm)	LVmass	E/A	LVID	% EF	% FS
Wild-type (n = 6)	5	0.022 $\pm$ 0.001	0.022 $\pm$ 0.0007	3.06 $\pm$ 0.34	2.11 $\pm$ 0.72	0.12 $\pm$ 0.002	64.88 $\pm$ 2.54	33.76 $\pm$ 1.74
<i>Pcca</i> <sup>-/-</sup> (A138T) (n = 7)	5	0.025 $\pm$ 0.003	0.025 $\pm$ 0.002*	3.09 $\pm$ 0.30	2.86 $\pm$ 0.98	0.14 $\pm$ 0.014*	60.61 $\pm$ 4.80	33.28 $\pm$ 4.36
Wild-type (n = 6)	8	0.021 $\pm$ 0.001	0.02 $\pm$ 0.002	3.08 $\pm$ 0.25	2.49 $\pm$ 0.56	0.11 $\pm$ 0.003	63.67 $\pm$ 6.34	34.45 $\pm$ 4.86
<i>Pcca</i> <sup>-/-</sup> (A138T) (n = 7)	8	0.024 $\pm$ 0.002**	0.02 $\pm$ 0.002	3.33 $\pm$ 0.29	3.01 $\pm$ 0.82	0.13 $\pm$ 0.014**	59.23 $\pm$ 4.10	31.25 $\pm$ 2.81

Abbreviations: EF, ejection fraction; FS, fractional shortening; IVS; d, diastolic interventricular septal thickness; LVPW; d, Diastolic left ventricular posterior wall thickness; LV mass, left ventricular mass; IVS; d, LVPW; d and LV mass parameters were indexed to body mass. E/A (a parameter of mitral flow); E wave (passive early diastolic filling); A wave (atrial contraction); LVID, left ventricular internal diameter. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. \**P* value < 0.05, \*\**P* value < 0.01.

**Histology and electron microscopy studies.** Mitochondrial dysfunction inherent to PA can lead to lipid accumulation in tissue; lipid droplets have been observed in muscle tissue from PA patients.<sup>14</sup> Cardiac tissues from the mice were analyzed by transmission electron microscopy. Hearts from wt mice contained regular sarcomere banding patterns with mitochondria evenly dispersed in relatively straight bands with no lipid droplets (Fig 1, top row). In contrast, there were increased numbers of light gray and white circular bodies consistent with the presence of lipid droplets in the hearts from PA mice (Fig 1, bottom rows).

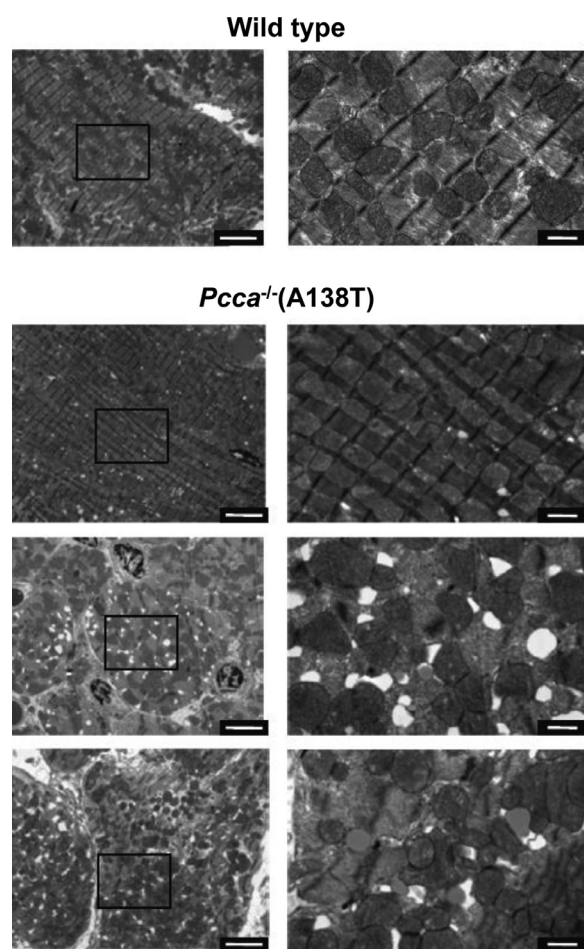
**Expression levels of cardiomiRs in PA mice hearts.** We selected a series of 13 miRNAs expressed in cardiac tissue and reported in the literature to be associated with cardiomyopathies (Supplementary Table 1) for their analysis in heart samples from wt and PA mice (n = 5

per group, 5 month-old males and females). The results showed a significant upregulation of 11 miRNAs, with miR-208a, miR-22, miR-199a, and miR-199b exhibiting the highest fold-increase (13-fold–15-fold) compared to samples from wt mice (Fig 2). The expression of miR-208a in PA mice hearts was further examined at different ages, in 2-month-old mice there is a moderate increase (3-fold compared to wt mice) while in 10-month-old mice its expression is reduced (0.2-fold) (data not shown).

**Analysis of signaling pathways and selected miRNA targets.** Our next aim was the investigation of altered cellular processes regulated by the identified miRNAs that could underlie the development of cardiomyopathy in PA. Thus, we analyzed signaling pathways and selected target genes of the miRNAs, previously functionally validated by modulating miRNA levels in different cellular and/or animal models of heart disease (Supplementary Table 1).

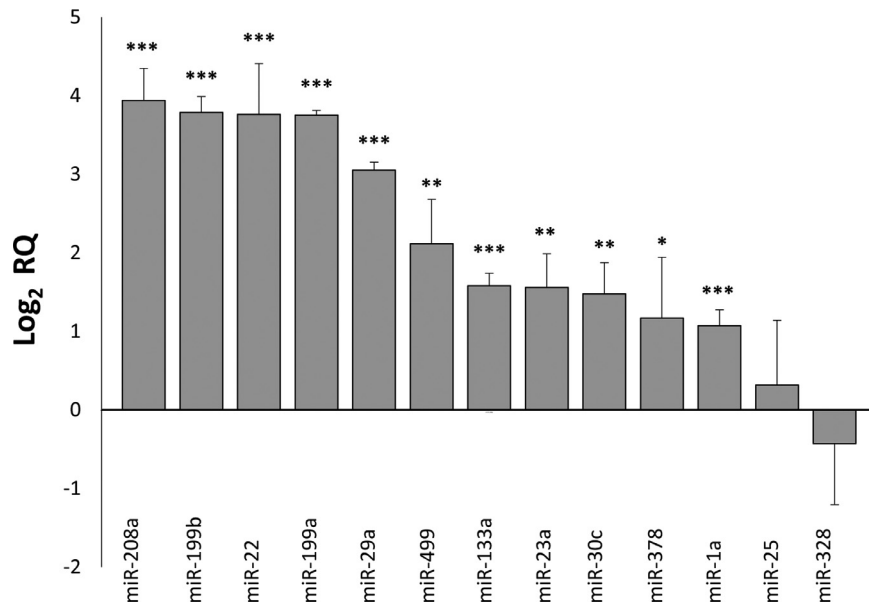
As a first step, we performed gene expression profiling in PA and wt mice heart samples (n = 8, grouped in 2 pools of 4 mice each, 5-month-old males and females), analyzing 84 genes involved in the PI3K/AKT pathway that has been shown to play a role in cardiac remodeling<sup>15</sup> and is regulated by several of the identified cardiomiRs. The analysis included members of the AKT and PI3K families and their regulators, genes involved in regulation of actin organization and cell migration, glycogen synthase kinase 3 inactivation and  $\beta$ -catenin accumulation, and genes in the insulin-like growth factor 1, mammalian target of rapamycin (mTOR), autophagy, and apoptotic pathways. Eighteen genes were downregulated and 15 upregulated, considering fold changes of >1.3 or <0.7 (Fig 3). Among the upregulated genes, there are several that promote cell survival/proliferation and/or with prohypertrophic function such as *Jun*, *Igf1r*, *Eif4b*, *Raf1*, *Pak1*, *Mtor*, *Plk3ca*, *Tcl1* or *Fos*. Genes involved in inflammatory responses were also found upregulated (*Tlr4*, *Tirap*, *Myd88*). On the other hand, genes regulating apoptosis (*Csnk2a1*, *Fasl*, *Foxo3*) exhibited decreased expression, as well as others regulating NF $\kappa$ B activation (*Chuk*, *Irk1*, *Nfkbia*). *Gjal*, encoding gap junction protein alpha expressed in the heart left ventricle and important for contraction, was also found downregulated, as well as *Pten* and *Tsc2*, known inhibitors of the mTOR pathway. The observed downregulation of *Pten*, validated target of miR-22, correlates with the observed increased expression of this miRNA, which is essential for cardiac growth and remodeling in response to stress.<sup>16</sup> Other targets of the identified dysregulated miRNAs in PA mice hearts are indicated in Fig 3.

In a next step, we sought to analyze in depth cardiac autophagy and mTOR activation in PA mouse heart

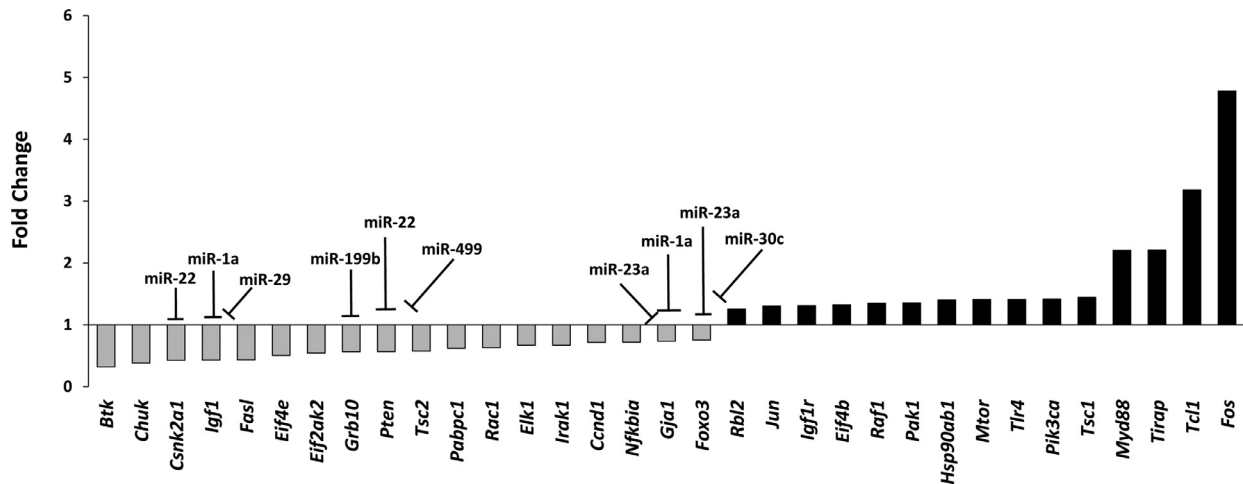


**Fig 1.** Transmission electron microscopy of cardiac tissue. Heart tissue of wt and PA mice was analyzed by TEM. Panels on the left were viewed at 5,000X magnification, with bars representing 5  $\mu$ m. Panels on the right correspond to the image within the boxes shown at 20,000X magnification, with bars representing 1  $\mu$ m.





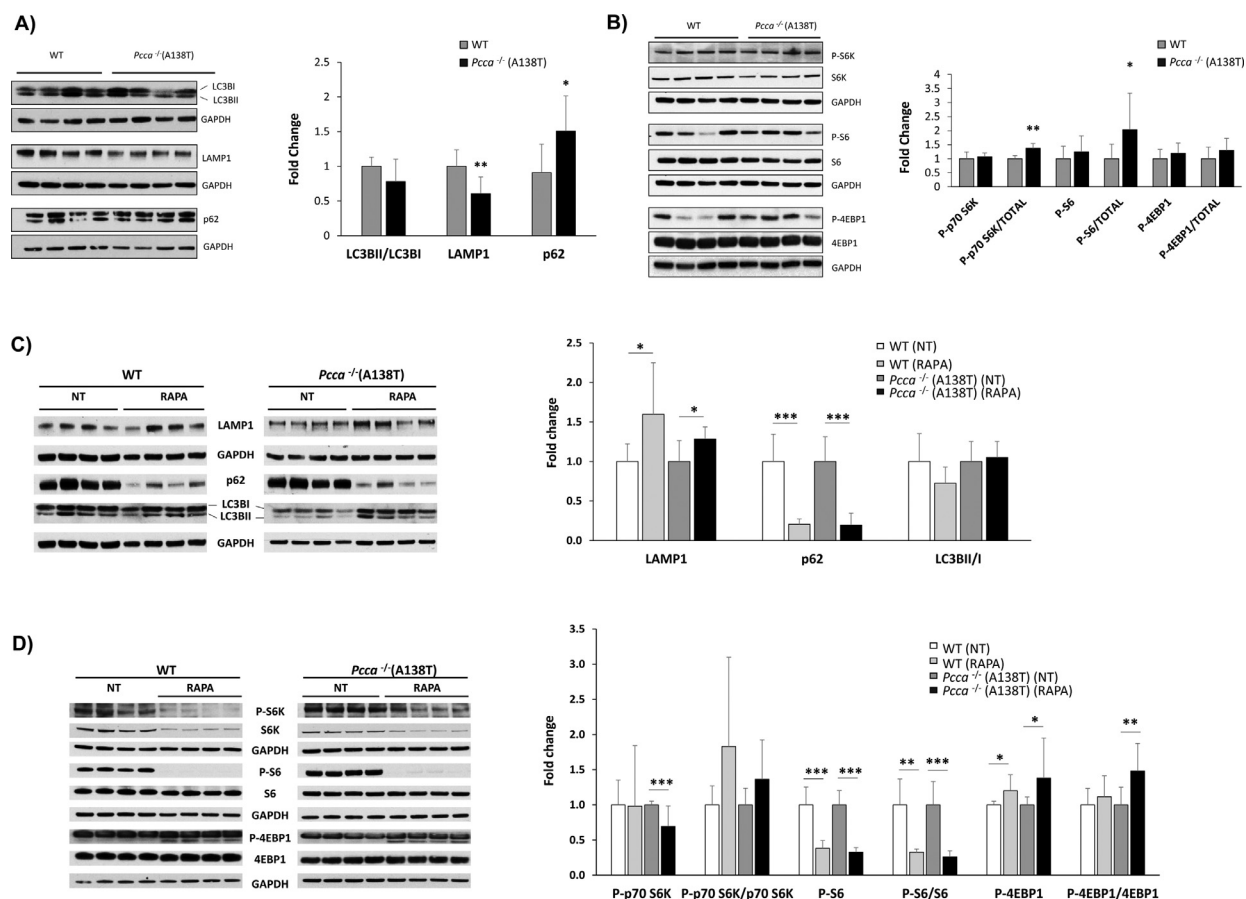
**Fig 2.** Relative expression analysis of selected miRNAs specifically expressed in cardiac tissue (cardiomirns). miRNA expression analysis was performed by qRT-PCR in heart samples from wt and PA mice (5 month-old, n=5 per group). Statistical significance was determined by Student's t-test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . RQ, relative quantity.



**Fig 3.** Dysregulated genes in PA mice hearts identified in the expression array of PI3K/Akt signaling pathway. Gene expression analysis was performed by qRT-PCR from cardiac pooled samples of wt and PA mice (5 month-old, n=8 per group). Upregulated miRNAs identified in PA mice hearts are shown above their respective targets.

tissue, based on the results of the PI3K/AKT array and on the described involvement of the mTOR pathway in the regulation of cardiomyocyte cell size mediated by miR-199a,<sup>17</sup> one of the miRNAs which we found most highly upregulated. The results showed a significant decrease in the autophagic marker LAMP1 and an increase in p62, indicating autophagy impairment (Fig 4, A) as well as activation of components of the mTOR signaling pathways in PA mice heart compared to

controls (Fig 4, B). Activation signature of the mTOR pathway and autophagy decrease was validated using the commercially available drug rapamycin. Acute treatment with this mTOR inhibitor (7 consecutive daily intraperitoneal injections with 2 mg/kg of rapamycin in wt and PA mice, n=9–10 per group) effectively reverted some of these alterations, increasing autophagy process (increasing levels of LAMP1 and decreasing levels of p62) (Fig 4, C) and decreasing levels of



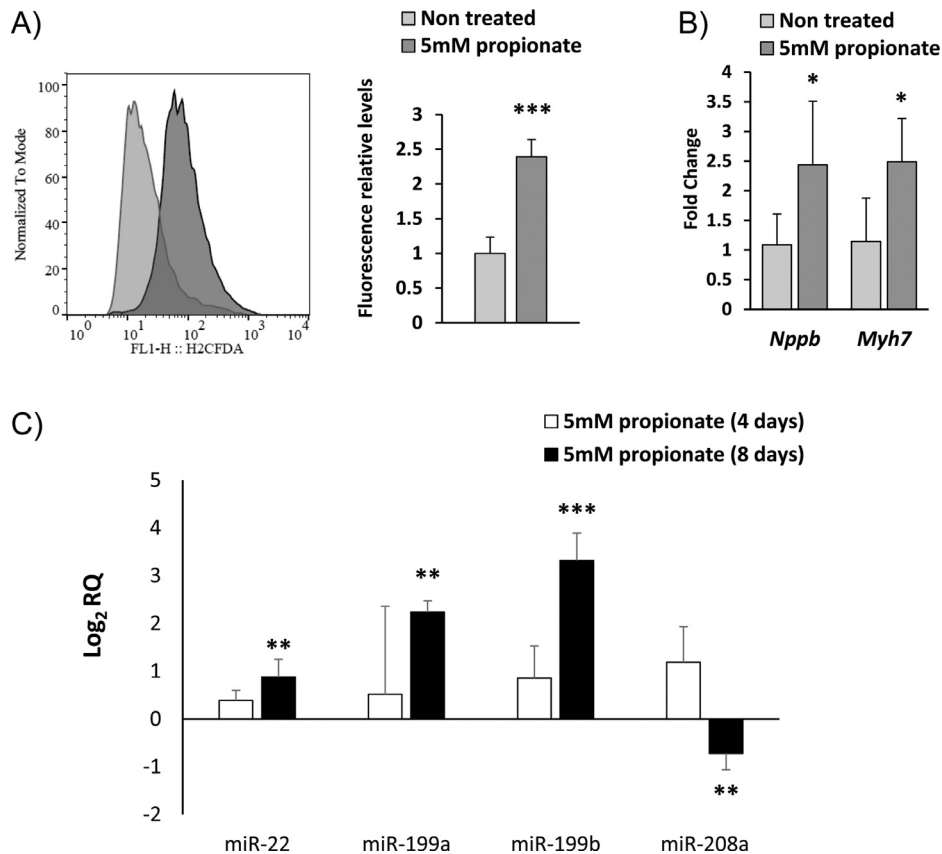
**Fig 4.** Analysis of protein levels of autophagy and the mTOR related signaling pathways. Heart samples from 5 month-old wt and PA mice (n = 5-10 per group) were analyzed by Western blot. Representative blots are shown on the left and on the right the corresponding quantification by laser densitometry of proteins involved in autophagy (LC3BI, LC3BII, LAMP1 and p62) (A, C) and protein synthesis (S6K, S6, 4EBP1, and the phosphorylated forms) (B, D). In each blot, GAPDH was used as a loading control. In C and D, protein values are shown relative to untreated controls. Statistical significance was determined by Student's t-test. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

proteins involved in mTOR pathway (Fig 4, D). Notably, rapamycin treatment in PA mice decreased the expression of *Nppb* and *Myh7* (Supplementary Figure 2).

In addition, we also investigated specific previously functionally validated targets of the dysregulated miRNAs, which could be contributing to PA cardiac dysfunction. miR-199a has been described to regulate metabolic switching from fatty acid oxidation to glycolysis during heart remodeling, through repression of the expression of cardiac peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  (PPAR $\delta$ ).<sup>18</sup> miR-208a is involved in the control of cardiac contractility in response to stress or hypothyroidism through the inhibition of MED13, a cofactor of the thyroid hormone nuclear receptor that represses  $\beta$ -MHC expression in the adult heart.<sup>19</sup> miR-133a represses the expression of caspase 3 and caspase 9 protecting cardiomyocytes from oxidative stress-mediated cell death.<sup>15</sup> Caspase 3 has also been

validated as a direct target of miR-378. Accordingly, in PA mice heart, we could confirm a significant decrease in the expression of these targets (*Ppard*, *Med13*, *Casp3*, and *Casp9*) (Supplementary Figure 3).

**Effect of propionate in HL-1 cardiomyocytes.** To investigate potential mechanisms triggering miRNA dysregulation in PA mice hearts and the contribution of accumulating toxic metabolites to the development of cardiac dysfunction, we analyzed the effect of propionate treatment in the cardiac murine cell line HL-1. Cells were treated during 4 days with 5 mM propionate (concentration detected in patients' plasma<sup>20</sup>) and the 4 miRNAs showing highest upregulation in PA mice hearts (miR-208a, miR-199b, miR-22, and miR-199a) were analyzed, as well as cardiac dysfunction markers and ROS levels. Propionate treatment resulted in an increase in ROS levels, as previously reported in different in vitro and in vivo models<sup>7</sup> and induced the expression of *Nppb* and *Myh7* (Fig 5, A and B).



**Fig 5.** Effect of propionate in the cardiac murine cell line HL-1. Cells were treated with 5mM propionate for 4 days and (A) ROS production was quantified by flow cytometry using the H<sub>2</sub>DCFDA probe, (B) expression of cardiac damage markers *Nppb* and *Myh7* were analyzed by qRT-PCR. (C) cardiomiRs (miR-22, miR-199a/b and miR-208a) were analyzed by qRT-PCR after 4 and 8 days of propionate treatment. Statistical significance was determined by Student's t-test. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001. RQ, relative quantity.

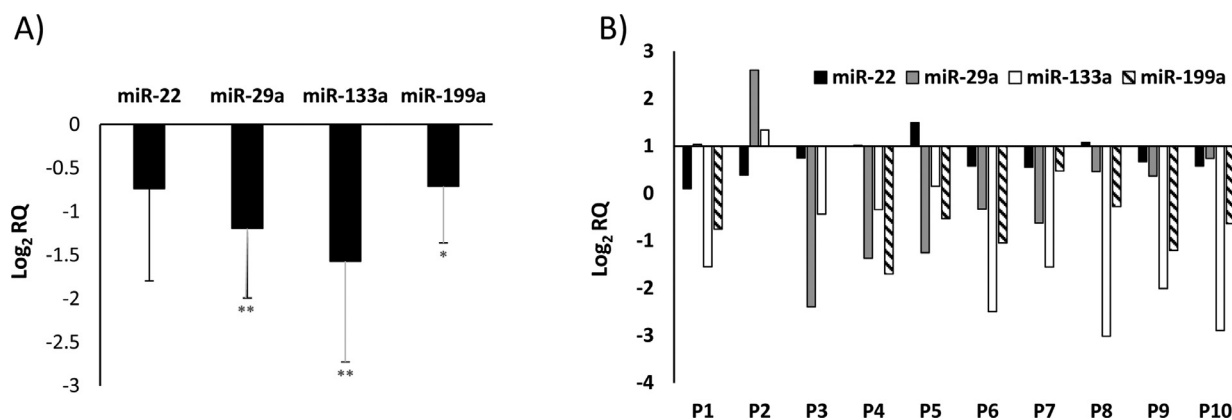
miRNA levels did not vary significantly after 4 days but longer exposures to propionate (8 days) resulted in the upregulation of miR-22, miR-199a, and miR-199b, while miR-208a levels decreased (Fig 5, C).

**miRNA analysis in PA patients' plasma samples.** Up to 70% of PA patients develop cardiomyopathy.<sup>8,9</sup> In order to determine the translatability of the results obtained in the mouse model we investigated the presence and the expression levels of the identified cardiomiRs in PA patients' plasma samples compared with matched control samples (>12 years of age; n = 10) (Table I). In this preliminary study, we analyzed 5 miRNAs showing highest upregulation in PA mice hearts (miR-208a, miR-22, miR-199a, miR-199b, and miR-29a) as well as miR-133a, a circulating miRNA studied in relation to fibrosis and DCM.<sup>21</sup> miR-208a and miR-199b could not be detected, which in the case of miR-208a could be attributed to the specific amplification technique used.<sup>22</sup> miR-22, miR-29a, miR-133a, and miR-199a were decreased in PA patients' samples (Fig 6, A). Closer inspection of the miRNA profile in individual patient samples revealed a specific pattern shared by most of

them (Fig 6, B), even though not all patients exhibited the same cardiac phenotype (Table I). Only patient 2 showed a clearly different miRNA profile with highly increased levels of miR-29a (Fig 6, B).

## DISCUSSION

Cardiomyopathy is a major health problem in PA patients, strongly influencing overall morbidity and mortality.<sup>8,9</sup> Although PA usually presents neonatally and is today included in newborn screening programs in some countries, there are cases of milder, even asymptomatic, patients presenting later with cardiomyopathy. To date, it is largely accepted that the bioenergetic deficiency and oxidative stress due to a secondary mitochondrial dysfunction contributes to the progressive decline of myocardial function in PA. We have recently shown redox-mediated alterations in sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2a) function impairing Ca<sup>2+</sup> handling as a new pathological mechanism involved in PA cardiomyopathy,<sup>11</sup> although additional factors are probably involved. There is an unmet clinical need to advance



**Fig 6.** Relative levels of miR-22, miR-29a, miR-133a and miR-199a in plasma samples from PA patients. miRNA relative expression analysis was performed by qRT-PCR. All samples were from PA patients and controls older than 12 years (n = 10 per group). (A) Representation of the mean levels of cardiomiRs and (B) miRNA profile for each patient. Statistical significance was determined by Student's t-test. \*\**P* < 0.01. \**P* < 0.05. RQ, relative quantity.

further in the understanding of PA cardiac pathology, to develop novel, better suited treatments, and to identify biomarkers for earlier diagnosis of this complication and for response to treatment. miRNAs are known to play an important role in cardiac development, dysfunction, and failure. In this study, we used the hypomorphic *Pcca*<sup>-/-</sup> (A138T) PA mouse model to analyze the expression of cardiac enriched miRNAs and their targets governing biological processes linked to cardiovascular disease.

Our results show structural defects and signs of diastolic dysfunction in PA mouse hearts and confirm the presence of specific markers of cardiac damage, including (1) gene expression reprogramming, as shown by upregulation of early immediate genes (*c-Fos*, *Jun*) and reactivation of a set of fetal cardiac genes (*Nppb* and *Myh7*), (2) increase in the expression of collagen genes indicating the appearance of myocardial fibrosis, and (3) increase in protein synthesis and decrease in autophagy (mTOR activation). In addition, we observe a decrease in caspases 3 and 9 levels, indicative of cardiac remodeling that accompanies the progression of cardiac pathology. We could also confirm a significant decrease in the expression of *Ppard*, coding for PPAR $\delta$ , the critical regulator of energy metabolism in heart, which is shifted toward glycolysis in the failing heart. In line with this, we previously documented a significant reduction in the fatty acid oxidation enzyme HADHA in PA mouse hearts.<sup>23</sup> In brief, the data reflect the complex cellular phenotype with multiple signaling pathways altered in PA mouse hearts.

Notably, this is the first study describing the in vivo dysregulation of cardiac-enriched miRNAs in PA which could be involved in the development of cardiac alterations. We sought for potential causes and consequences of those changes and identified propionate as an

exogenous factor which may trigger the alterations in the expression of these miRNAs, although other mechanisms may act in concert. miRNA expression is regulated at both transcriptional and post-transcriptional levels, with documented direct and indirect effects of certain endogenous (chemokines, hormones) and exogenous (xenobiotics) compounds.<sup>24</sup> Propionate is a known histone deacetylase inhibitor<sup>25</sup> and cardiac remodeling and hypertrophy has been linked to histone acetylation.<sup>26</sup> In addition, propionyl-CoA was recently shown to stimulate transcription through an increase in histone 3 lysine propionylation (H3K4pr), thereby linking the metabolic state of the cell with chromatin architecture.<sup>27</sup> Livers of the hypomorphic PA mouse model display higher levels of H3K14pr which revert to wild-type levels after gene therapy.<sup>27</sup> Another plausible explanation is that miRNA dysregulation may be driven by a ROS signaling mechanism, as increased propionate levels induce ROS elevation resulting in oxidative damage, both in vivo and in vitro as shown in this work and in previous studies.<sup>28</sup> In turn, ROS are known to activate signaling kinases and transcription factors, mediate apoptosis and stimulate cardiac fibroblast proliferation leading to cardiac remodeling.<sup>29</sup>

Eleven of the studied miRNAs were found upregulated in the PA mouse heart, with miR-208a, miR-199b, miR-22, miR-199a and showing >13-fold increased levels compared to wt samples. Except for miR-208a, the expression of these miRNAs was induced in cardiomyocytes upon propionate treatment. miR-208a plays a crucial role in heart health and disease, regulating cardiac contractility, hypertrophy pathway components, and cardiac conduction system. It is encoded by an intron of the *Myh6* gene and upon cardiac stress induces the expression of the dominant

embryonic myosin isoform  $\beta$ -MHC (which we find increased in PA mouse hearts), contributing to diminishing cardiac performance.<sup>19</sup> In DCM patients this miRNA has been described as a predictor of cardiac death and progression of heart failure, with higher endomyocardial levels associated with adverse clinical outcomes.<sup>30</sup> Recently, a negative feedback loop between ROS and miR-208a was recently shown in cultured rat cardiomyocytes, with ROS attenuating miR-208a expression,<sup>31</sup> which could explain our results in propionate treated cardiomyocytes. miR-199a is involved in mTOR activation and autophagy and in mitochondrial fatty-acid oxidation impairment.<sup>17,18</sup> We have confirmed decreased *Ppard* expression, a direct target of miR-199a mediating cardiac fuel switch from fatty acid to glucose, which is also observed in normal rat hearts perfused with high exogenous propionate,<sup>32</sup> again providing a possible link between the accumulating metabolite in PA, a dysregulated miRNA and developing heart failure. Our data have also revealed an impairment in the autophagic flux in PA mouse hearts due to elevated mTOR signaling, which could contribute to cardiac pathology and that could be restored by rapamycin. Rapamycin ester temsirolimus, an FDA-approved drug with more favorable pharmaceutical properties and mild side effects,<sup>33</sup> may be an attractive therapeutic option for PA patients exhibiting cardiomyopathy.

Furthermore, the miRNAs identified in our study can be considered per se as potential therapeutic targets. miRNA-based therapeutics is currently an increasing field of research, with the development of drugs aiming to inhibit (antagomiRs) or overexpress (miRNA mimics) specific miRNAs altered in disease.<sup>34</sup> Future studies will elucidate whether this approach is applicable in the PA mouse model, due to the observed complex changes in different cellular processes regulated by multiple miRNAs. In DCM, few miRNAs have been directly implicated as therapeutic targets, although the overexpression of miR-699a resulting in a long-term benefit for severe chronic myotonic dystrophy-associated DCM represents a landmark case.<sup>35</sup>

The presence of dysregulated circulating cardiomiRs in PA patients' samples provides strong evidence of the clinical significance of our study. As in other diseases<sup>36</sup> we observe opposed changes in expression in tissues versus plasma samples (upregulated and downregulated, respectively), which can be due to different regulatory processes in mice and humans, as well as to the fact that miRNAs are mostly actively secreted as a specific biological process and circulating miRNAs do not reflect intracellular levels. Although the low number of samples analyzed (a common limitation in the field of rare genetic diseases) precludes drawing definitive conclusions, the

distinct miRNA signatures also support their potential applicability as biomarkers of disease progression or of response to treatment. However, given the low concentration of circulating cardiomiRs in plasma samples, which is further decreased in PA patients, the use of alternative profiling methods such as next generation sequencing which may provide lower detection limits and accurate quantification,<sup>37</sup> should be evaluated and differences rigorously validated. It is worth noting that some of the patients showing an altered circulating miRNA profile exhibited no cardiac manifestations at the time of the analysis and that the only patient under specific treatment for cardiac disease exhibits a different miRNA profile (P2 in Fig 6, B). Our results constitute a starting point for a wider international study including different PA patient cohorts with documented clinical histories relative to cardiac phenotypes. It will be interesting to confirm if early metabolic and signaling dysregulations and miRNA and gene expression alterations precede overt cardiomyopathy in PA, as has been documented for other monogenic diseases.<sup>38</sup> In addition and as cardiomyopathies may be reversed after liver transplantation in PA patients,<sup>39</sup> the analysis of circulating cardiomiRs before and after this intervention will confirm the involvement of these miRNAs in PA-associated cardiomyopathy.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are aware of the journal's authorship statement and declare no conflict of interest. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

The technical assistance of Elena Montalvo and the expert advice of the staff at CNIC Imaging Facility are gratefully acknowledged. The authors thank Federación Española de Enfermedades Metabólicas Hereditarias and the patients' families for their collaboration and for agreeing to participate in the study. This work was supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and European Regional Development Fund (grant number SAF2016-76004-R) and by Fundación Isabel Gemio and Fundación La Caixa (LCF/PR/PR16/11110018). AFG is funded by the FPI-UAM program, EAB and ARB by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (predoctoral fellowships FPU15/02923 and BES-2014-069420, respectively). Centro de Biología Molecular Severo Ochoa receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

#### SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:[10.1016/j.trsl.2019.12.004](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.12.004).

REFERENCES

1. Gosline SJ, Gurtan AM, JnBaptiste CK, et al. Elucidating microRNA regulatory networks using transcriptional, post-transcriptional, and histone modification measurements. *Cell Rep* 2016;14:310–9.
2. Rivera-Barahona A, Perez B, Richard E, Desviat LR. Role of miRNAs in human disease and inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2017;40:471–80.
3. De Guire V, Robitaille R, Tetreault N, et al. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clin Biochem* 2013;46:846–60.
4. Li Y, Peng T, Li L, et al. MicroRNA-9 regulates neural apoptosis in methylmalonic acidemia via targeting BCL2L11. *Int J Dev Neurosci* 2014;36:19–24.
5. Frankel LB, Di Malta C, Wen J, Eskelinen EL, Ballabio A, Lund AH. A non-conserved miRNA regulates lysosomal function and impacts on a human lysosomal storage disorder. *Nat Commun* 2014;5:5840.
6. Rivera-Barahona A, Fulgencio-Covian A, Perez-Cerda C, et al. Dysregulated miRNAs and their pathogenic implications for the neurometabolic disease propionic acidemia. *Sci Rep* 2017;7:5727.
7. Richard E, Perez B, Perez-Cerda C, Desviat LR. Understanding molecular mechanisms in propionic acidemia and investigated therapeutic strategies. *Expert Opin Orphan Drugs* 2015;3:1427–38.
8. Pena L, Burton BK. Survey of health status and complications among propionic acidemia patients. *Am J Med Genet A* 2012;158A:1641–6.
9. Haijes HA, Jans JJM, Tas SY, Verhoeven-Duif NM, van Hasselt PM. Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 1: Complications. *J Inherit Metab Dis* 2019;42:730–44.
10. Guenzel AJ, Hofherr SE, Hillestad M, et al. Generation of a hypomorphic model of propionic acidemia amenable to gene therapy testing. *Mol Ther* 2013;21:1316–23.
11. Tamayo M, Fulgencio-Covian A, Navarro-Garcia JA, et al. Intracellular calcium mishandling leads to cardiac dysfunction and ventricular arrhythmias in a mouse model of propionic acidemia. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866:165586.
12. Moran CM, Thomson AJ, Rog-Zielinska E, Gray GA. High-resolution echocardiography in the assessment of cardiac physiology and disease in preclinical models. *Exp Physiol* 2013;98:629–44.
13. Schnelle M, Catibog N, Zhang M, et al. Echocardiographic evaluation of diastolic function in mouse models of heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 2018;114:20–8.
14. Schwab MA, Sauer SW, Okun JG, et al. Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J* 2006;398:107–12.
15. Wang J, Liew OW, Richards AM, Chen YT. Overview of MicroRNAs in cardiac hypertrophy, fibrosis, and apoptosis. *Int J Mol Sci* 2016;17:749.
16. Xu XD, Song XW, Li Q, Wang GK, Jing Q, Qin YW. Attenuation of microRNA-22 derepressed PTEN to effectively protect rat cardiomyocytes from hypertrophy. *J Cell Physiol* 2012;227:1391–8.
17. Li Z, Song Y, Liu L, et al. miR-199a impairs autophagy and induces cardiac hypertrophy through mTOR activation. *Cell Death Differ* 2017;24:1205–13.
18. el Azzouzi H, Leptidis S, Dirkx E, et al. The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a-214 targets myocardial PPARdelta and impairs mitochondrial fatty acid oxidation. *Cell Metab* 2013;18:341–54.
19. Callis TE, Pandya K, Seok HY, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 2009;119:2772–86.
20. Feliz B, Witt DR, Harris BT. Propionic acidemia: a neuropathology case report and review of prior cases. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:e325–8.
21. Rubis P, Toton-Zuranska J, Wisniowska-Smialek S, et al. Relations between circulating microRNAs (miR-21, miR-26, miR-29, miR-30 and miR-133a), extracellular matrix fibrosis and serum markers of fibrosis in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2017;231:201–6.
22. Sygitowicz G, Tomaniak M, Blaszczyk O, Koltowski L, Filipiak KJ, Sitkiewicz D. Circulating microribonucleic acids miR-1, miR-21 and miR-208a in patients with symptomatic heart failure: Preliminary results. *Arch Cardiovasc Dis* 2015;108:634–42.
23. Gallego-Villar L, Rivera-Barahona A, Cuevas-Martin C, et al. In vivo evidence of mitochondrial dysfunction and altered redox homeostasis in a genetic mouse model of propionic acidemia: Implications for the pathophysiology of this disorder. *Free Radic Biol Med* 2016;96:1–12.
24. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med* 2016;14:143.
25. Silva LG, Ferguson BS, Avila AS, Faciola AP. Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells. *J Anim Sci* 2018;96:5244–52.
26. Bagchi RA, Weeks KL. Histone deacetylases in cardiovascular and metabolic diseases. *J Mol Cell Cardiol* 2019;130:151–9.
27. Kebede AF, Nieborak A, Shahidian LZ, et al. Histone propionylation is a mark of active chromatin. *Nat Struct Mol Biol* 2017;24:1048–56.
28. Richard E, Gallego-Villar L, Rivera-Barahona A, et al. Altered redox homeostasis in branched-chain amino acid disorders, organic acidurias, and homocystinuria. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018:1246069.
29. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H2181–90.
30. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M. Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2010;16:404–10.
31. Liu A, Sun Y, Yu B. MicroRNA-208a Correlates Apoptosis and Oxidative Stress Induced by H2O2 through Protein Tyrosine Kinase/Phosphatase Balance in Cardiomyocytes. *Int Heart J* 2018;59:829–36.
32. Wang Y, Christopher BA, Wilson KA, et al. Propionate-induced changes in cardiac metabolism, notably CoA trapping, are not altered by l-carnitine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2018;315:E622–E33.
33. Roskoski R Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacol Res* 2019;144:19–50.
34. Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res* 2016;7:68–74.
35. Quattrocchi M, Crippa S, Montecchiani C, et al. Long-term miR-669a therapy alleviates chronic dilated cardiomyopathy in dystrophic mice. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e000284.
36. Roberts TC, Blomberg KE, McClorey G, et al. Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the microRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2012;1:e39.

37. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L, et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 2014;11:809–15.
38. Khairallah M, Khairallah R, Young ME, Dyck JR, Petrof BJ, Des Rosiers C. Metabolic and signaling alterations in dystrophin-deficient hearts precede overt cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:119–29.
39. Romano S, Valayannopoulos V, Touati G, et al. Cardiomyopathies in propionic aciduria are reversible after liver transplantation. *J Pediatr* 2010;156:128–34.