



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Doctorado en Biociencias Moleculares

INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN LAS CARDIOMIOPATÍAS ASOCIADAS A LA ACIDEMIA PROPIÓNICA

TESIS DOCTORAL

Alejandro Fulgencio Covián

Madrid, 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN LAS CARDIOMIOPATÍAS ASOCIADAS A LA ACIDEMIA PROPIÓNICA

Memoria presentada por el graduado en Bioquímica

Alejandro Fulgencio Covián

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

Profesoras 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 (CBMSO) y en dos estancias cortas en el Leiden University Medical Center (LUMC). Este trabajo ha sido posible gracias a una ayuda de posgrado para la Formación de Personal Investigador (FPI-UAM) y a las ayudas para la movilidad predoctoral comprendidas dentro del marco de estancias breves para beneficiarios del programa FPI-UAM y de la Acción COST CA17103 (*short-term scientific mission*).

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	13
1. Fisiología cardiovascular.....	15
1.1. Función y contracción cardiaca	16
1.2. Patologías cardiacas	19
1.2.1. Cardiomiopatías de remodelado estructural.....	19
1.2.2. Alteraciones electrofisiológicas	20
2. Acidemia propiónica.....	22
2.1. Fisiopatología y presentación clínica	23
2.1.1. Cardiomiopatías en AP.....	25
2.2. Tratamiento	26
2.3. Modelos de enfermedad	27
2.3.1. Modelos animales	27
2.3.2. Modelos celulares	28
3. miRNAs.....	29
3.1. Biogénesis, función y mecanismo de acción de miRNAs.....	29
3.2. Implicación de los miRNAs en procesos fisiológicos y patológicos.....	31
3.3. miRNAs como biomarcadores en enfermedad.....	33
3.4. Aplicaciones terapéuticas de los miRNAs	33
3.4.1. Terapias de inhibición de miRNAs	34
3.4.2. Terapias de sobreexpresión	35
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. MATERIALES	43
1.1. Modelo murino de AP	43
1.2. Líneas celulares.....	43
1.3. Muestras de plasma de controles y pacientes de AP	43
1.4. Anticuerpos.....	44
1.5. Oligonucleótidos.....	46
1.6. Reactivos y otros materiales	49
1.7. Herramientas informáticas	53
2. MÉTODOS.....	54
2.1. Cultivos celulares	54

2.1.1.	Mantenimiento de los cultivos.....	54
2.1.2.	Transfecciones	54
2.1.3.	Tratamiento con propionato sódico	54
2.1.4.	Caracterización de la línea isogénica de iPSC derivada de un paciente PCCB.....	55
2.1.4.1.	Diferenciación <i>in vitro</i> a las 3 capas germinales	55
2.1.4.2.	Estudio del cariotipo.....	55
2.1.4.3.	Análisis de microsatélites	55
2.2.	Citometría de flujo.....	56
2.3.	Microscopía confocal.....	56
2.4.	Técnicas de ácidos nucleicos	58
2.4.1.	Aislamiento de ácidos nucleicos.....	58
2.4.2.	Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos	59
2.4.3.	RT-PCR cuantitativa.....	59
2.4.4.	Panel de expresión de PI3K-AKT.....	60
2.4.5.	Edición génica mediante CRISPR-Cas9	60
2.4.6.	Amplificación y análisis de DNA	61
2.4.7.	PCR digital (ddPCR).....	61
2.4.8.	Clonación de productos de PCR.....	62
2.4.9.	Purificación y secuenciación de productos de PCR	62
2.5.	Técnicas de proteínas	62
2.5.1.	Extracción de proteínas de células y tejidos	62
2.5.2.	Separación de proteínas en geles SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección	63
2.5.3.	Estudios de proteómica	64
2.5.4.	Microarray de proteína en fase reversa (RPPma).....	65
2.6.	Estudios <i>in vivo</i>	66
2.6.1.	Ecocardiograma de ratón.....	66
2.6.2.	Tratamiento con antimir-208a	66
2.6.3.	Tratamiento con bezafibrato	67
2.7.	Análisis estadístico.....	67
RESULTADOS.....		69
1.	Caracterización de la fisiopatología cardíaca en el modelo murino <i>Pcca</i>^{-/-} (A138T).....	71
1.1.	Análisis de la función cardíaca por ecocardiograma	71
1.2.	Análisis de la expresión de los marcadores de daño cardíaco y colágenos.....	72
1.3.	Estudios proteómicos	74

1.4.	Estudio de vías de señalización implicadas en el desarrollo de cardiomiopatías	77
1.4.1.	Análisis de expresión de genes de la vía PI3K-AKT.....	78
1.4.2.	Estudio de la activación de las kinasas de estrés p38 y JNK	78
2.	Expresión de miRNAs potencialmente implicados en la fisiopatología cardiaca en AP	80
2.1.	Análisis de miRNAs específicos de corazón o cardiomiRs en el modelo murino de AP	80
2.1.1.	Estudio de expresión de cardiomiRs	80
2.1.2.	Análisis de las dianas potenciales de los cardiomiRs	83
2.2.	Validación funcional de las dianas del miR-350-3p y miR-338-3p	86
2.3.	Análisis de miRNAs circulantes en plasma de pacientes AP	87
3.	Análisis del efecto del propionato en cardiomiocitos HL-1	90
3.1.	Análisis de los niveles intracelulares de ROS.....	90
3.2.	Análisis de expresión de marcadores de daño cardiaco y cardiomiRs	91
3.3.	Análisis de reorganización del citoesqueleto de actina	92
4.	Nuevas aproximaciones terapéuticas en el modelo murino de AP.....	94
4.1.	Tratamiento con oligonucleótidos antisentido contra el miR-208a-3p.....	94
4.2.	Tratamiento con bezafibrato	97
4.2.1.	Estudio de biogénesis mitocondrial	97
4.2.2.	Estudio de expresión de cardiomiRs	98
4.2.3.	Microarray de proteína en fase reversa (RPPma)	99
5.	Generación y caracterización de un modelo control isogénico a partir de iPSCs de un paciente de AP mediante edición génica con CRISPR-Cas9	102
5.1.	Edición génica de la línea de iPSC mediante el sistema CRISPR-Cas9.....	102
5.2.	Caracterización de la línea isogénica de iPSC generada.....	103
	DISCUSIÓN	107
1.	Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de cardiomiopatías en AP: papel de los miRNAs y nuevas aproximaciones terapéuticas	109
2.	Generación y caracterización de la línea celular iPSC PCCB WT-isogénico	122
	CONCLUSIONES	125
	CONCLUSIONS	129
	BIBLIOGRAFÍA.....	133
	PUBLICACIONES.....	149

ABREVIATURAS

AATK	<i>Apoptosis-associated tyrosine kinase</i>
AGO	Proteína argonauta
ANP	Péptido natriurético del atrio (<i>atrial natriuretic peptide</i>)
AON	Oligonucleótido antisentido (<i>antisense oligonucleotide</i>)
AP	Acidemia propiónica
AP-1	Complejo Jun-Fos
ATP5G1	Subunidad de la ATP sintasa
AV	Aurículo-ventricular
BF	Bezafibrato
BNP	Péptido natriurético del cerebro (<i>brain natriuretic peptide</i>)
CaMK	Calcio-calmodulina quinasa
Cas9	<i>CRISPR associated</i>
αCGDH	α -cetoglutarato deshidrogenasa
CH	Hipertrofia cardíaca (<i>Cardiac hypertrophy</i>)
CnA	Calcineurina
CORE2	Complejo III de la cadena de transporte de electrones
CPT1	Carnitina O-palmitoiltransferasa 1
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
CTE	Cadena de transporte de electrones
DCM	Cardiomiopatía dilatada (<i>Dilated cardiomyopathy</i>)
ddPCR	PCR digital (<i>digital droplet PCR</i>)
DGCR8	<i>DiGeorge Critical Region 8</i>
ENO1	Enolasa
ERR	Receptor de tipo estrógeno (<i>Estrogen-related receptors</i>)
ETFA	Flavoproteína transportadora de electrones (<i>electron transport flavoprotein A</i>)
βF1	Subunidad β de la ATP sintasa
FC	Fallo cardíaco
FE	Fracción de eyección
FS	Fracción de acortamiento (<i>fractional shortening</i>)
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GPD1	Glicerol fosfato deshidrogenasa 1
H₂DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
HADHA	Enzima trifuncional mitocondrial

HDAC	Histona deacetilasa
IF1	Inhibidor de la ATPasa
I_{ks}	Corrientes lentas de K ⁺
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
iRNA	RNA interferente (<i>interfering RNA</i>)
IVS	Septo interventricular
JNK	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>
KO	<i>Knock out</i>
LNA	<i>Locked nucleic acids</i>
lncRNA	RNA no codificante largo (<i>long non-coding RNA</i>)
LV vol (d)	Volumen telediastólico
LV vol (s)	Volumen telesistólico
LVID	Diámetro interno del ventrículo izquierdo
LVPW	Pared posterior del ventrículo izquierdo
Med13/Thrap1	<i>Thyroid hormone receptor associated protein</i>
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
MFN2	Mitofusina 2
MHC	Cadena pesada de la miosina (myosin heavy chain)
miRNA	microRNA
mtDNA	DNA mitocondrial
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NAGS	N-acetilglutamato sintasa
ncRNA	RNA no codificante (<i>non-coding RNA</i>)
NCX	Intercambiador Na ⁺ -Ca ²⁺ (Na ⁺ -Ca ²⁺ exchanger)
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NRF	<i>Nuclear respiratory factors</i>
p38	<i>Mitogen-activated protein kinase 11</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PCC	Propionil-CoA carboxilasa
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PGC-1	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor coactivators 1</i>
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PIP₂	Fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato
PIP₃	Fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato
piRNA	piwiRNA

PKA	Proteína kinasa A
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primario
PRX3	Peroxirredoxina 3
PRX6	Peroxirredoxina 6
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNApol	RNA polimerasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
RPPma	Array de proteínas en fase reversa (<i>Reverse phase protein microarray</i>)
RS	Retículo sarcoplásmico
RyR	Canal receptor de rianodina
SA	Seno-auricular
SCS	Succinil-CoA sintetasa
SERCA2	<i>Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
siRNA	RNA interferente corto (<i>short interfering RNA</i>)
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	Superóxido dismutasa 1
SOD2	Superóxido dismutasa 2
Tm	Tropomiosina
Tn	Troponina
TnC	Troponina C
TnT	Troponina T
TRBP	TAR RNA binding protein
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
TXN	Tioxirredoxina
UTR	Región no traducida (<i>untranslated region</i>)
WB	Western Blot
WT	<i>Wild-type</i>

RESUMEN

La acidemia propiónica (AP) es una enfermedad metabólica hereditaria causada por mutaciones en los genes *PCCA* o *PCCB*, lo que provoca la deficiencia en la enzima mitocondrial propionil-CoA carboxilasa. La AP es una enfermedad clínicamente heterogénea, presentándose de forma neonatal o tardía y cursando con una sintomatología multisistémica donde las alteraciones cardíacas suponen una de las principales complicaciones letales de la enfermedad.

En este trabajo se ha caracterizado la función cardíaca del modelo murino de AP por ecocardiograma, reflejando indicios de una reducción de la capacidad contráctil del corazón. Por otro lado, los estudios moleculares realizados en el corazón del ratón AP mostraron la alteración en las vías de señalización PI3K-AKT y la ruta de las kinasas de estrés, implicadas en remodelado cardíaco. Además, el análisis proteómico en cardiomiocitos aislados reflejó una desregulación generalizada del proteoma celular, identificando un incremento en la oxidación de la proteína SERCA2a, que podría causar una alteración de su función conduciendo al desarrollo de arritmias.

Asimismo, la identificación de 13 cardiomiRs sobreexpresados en el corazón del modelo murino de la enfermedad y la disminución de sus dianas potenciales podría ser indicativo de la implicación de los miRNAs en el desarrollo de cardiomiopatías en AP. Sin embargo, en un estudio preliminar, el uso de un LNA-antimiR-208a no ha sido suficiente para normalizar los niveles de este miRNA y prevenir el daño cardíaco. Finalmente, la identificación de perfiles diferenciados de cardiomiRs circulantes entre individuos control y pacientes AP reflejaría su potencial uso como biomarcadores mínimamente invasivos para el seguimiento y pronóstico de la sintomatología cardíaca de AP.

Por otra parte, el estudio *in vitro* en los cardiomiocitos HL-1 ha permitido identificar al propionato como un factor desencadenante del daño cardíaco en AP, a través de la detección de niveles aumentados de especies reactivas de oxígeno, y de alteraciones en los niveles de los marcadores BNP y β -MHC y en el perfil de expresión de cardiomiRs. Además, la evaluación del tratamiento del agonista de PPAR bezafibrato, en el modelo murino de la enfermedad, ha mostrado un incremento de la expresión de los marcadores de biogénesis mitocondrial, así como una mejora del metabolismo energético, dinámica mitocondrial y homeostasis redox en el corazón del ratón AP.

Por último, con objeto de trasladar los resultados obtenidos en el modelo murino a un contexto genómico humano, en este trabajo se ha generado mediante CRISPR-Cas9 un control *wild-type* isogénico a partir de una línea de iPSC de un paciente AP, manteniendo su fondo genético y las características de pluripotencia de estas células, que servirá para estudios futuros de fisiopatología y testaje de terapias tras la diferenciación a cardiomiocitos y otros linajes celulares afectados en AP.

ABSTRACT

Propionic acidemia (PA) is an inherited metabolic disorder caused by mutations in either *PCCA* or *PCCB* genes, which leads to the deficiency in the mitochondrial enzyme propionyl-CoA carboxylase (PCC). PA is considered a clinically heterogeneous disease, and it can present as a neonatal form or as a late onset disease, with a multisystemic symptomatology in which cardiac alterations are one of the main life-threatening complications.

We have characterized by echocardiogram the cardiac function in the mouse model of the disease, finding evidence of reduced contractility. Likewise, molecular analysis in PA mice hearts showed alterations in the PI3K-AKT and stress kinases signaling pathways, both of them involved in cardiac remodeling. Besides, proteomic analysis in isolated cardiomyocytes confirmed a global deregulation in the protein content of these cells, along with an increase in SERCA2a protein oxidation, which could provoke alterations in its function leading to the development of arrhythmias.

Furthermore, the detection of 13 cardiomiRs overexpressed in hearts from PA mice and the decreased levels of their potential targets could be indicative of the involvement of miRNAs in the development of cardiomyopathies in PA. Nevertheless, in a preliminary study, treatment with an LNA-antimiR-208a was not sufficient to normalize the expression level of this miRNA and to prevent cardiac remodeling. Finally, we identified different signatures of miRNA expression profiles in plasma samples from control individuals and PA patients, which might reflect their potential utility as minimally invasive biomarkers for the monitoring and prognosis of cardiac alterations in PA.

Additionally, *in vitro* studies in HL-1 cardiomyocytes allowed us to detect propionate as one of the triggers in the development of cardiac alterations in PA through the detection of increased levels of reactive oxygen species and the alteration in the expression levels of cardiac markers BNP and β -MHC and expression profile of cardiomiRs. Besides, we tested the potential benefits of the treatment with the PPAR pan-agonist bezafibrate in the PA mouse. This set of experiments revealed that bezafibrate is able to produce not only an increase in the expression of mitochondrial biogenesis markers, but also an improvement in the energetic metabolism, mitochondrial dynamics and redox homeostasis in PA mice hearts.

Finally, in order to transfer our results from the PA mice to a human genomic context, using CRISPR-Cas9 we generated a wild-type isogenic control from an iPS cell line from a PA patient, maintaining the genetic background and the pluripotency of these cells. This model will be used for pathophysiology and therapeutic studies after the differentiation into cardiomyocytes and other cellular lineages affected in PA disease.

INTRODUCCIÓN

1. Fisiología cardiovascular

Los organismos vertebrados presentan una organización corporal jerárquica en la que se produce una agrupación de elementos más pequeños para generar una estructura de mayor tamaño. De esta manera, las células se agrupan para formar tejidos, que a su vez dan lugar a la formación de órganos, que finalmente se asocian según su función para constituir un sistema. El funcionamiento de estos sistemas depende de que cada uno de los elementos que lo constituyen reciba un aporte adecuado de nutrientes y oxígeno, así como de que se produzca una eliminación correcta de los productos de desecho. Esta función es desempeñada por el sistema cardiovascular (Mohrmann, 2007).

Aparte del transporte de gases y nutrientes, las funciones del sistema cardiovascular incluyen el mantenimiento de la homeostasis mediante la regulación de la temperatura corporal, el pH y la concentración de iones, así como formar una barrera protectora frente a toxinas, infecciones por patógenos y heridas mecánicas. Para ello, este sistema cuenta con tres elementos fundamentales:

- La sangre: fluido en el que se transportan nutrientes, gases, iones, hormonas, etc., hacia los distintos órganos.
- El corazón: estructura central del sistema cardiovascular que permite el bombeo continuo de sangre hacia los tejidos.
- Vasos sanguíneos: red que permite canalizar la sangre y en la que se diferencian tres tipos de estructuras. Las arterias y arteriolas, que transportan la sangre desde el corazón a los tejidos; los capilares, vasos más pequeños que irrigan los tejidos y permiten el intercambio de sustancias; y las venas y vénulas, que transportan la sangre desde los tejidos hacia el corazón.

Tradicionalmente el sistema cardiovascular se ha dividido en dos circuitos, en función de a qué órganos se dirige la sangre (Mohrmann, 2007), separados por la división del corazón en cuatro cámaras. De esta manera, el ventrículo derecho bombearía sangre no oxigenada o sangre venosa hacia los pulmones, que volvería cargada de oxígeno a través de la vena pulmonar a la aurícula izquierda del corazón, cerrando así la circulación pulmonar. Por otro lado, el ventrículo izquierdo bombea la sangre oxigenada o arterial al resto de los tejidos y órganos del cuerpo, donde se produce el intercambio de gases para finalmente volver a través de la vena cava a la aurícula derecha del corazón, lo que constituye la circulación sistémica.

A través del corazón el sistema cardiovascular presenta la capacidad de adaptar el aporte de sangre o gasto cardiaco según las necesidades de los distintos tejidos. Para ello, el corazón regula

su capacidad contráctil, modificando el ritmo del latido cardiaco o el volumen de sangre que se bombea en cada latido (Mohrmann, 2007).

1.1. Función y contracción cardiaca

El corazón se localiza en el interior de la cavidad torácica, rodeado por un tejido fibroso conocido como pericardio que ejerce una función protectora. A nivel estructural, el corazón presenta una capa exterior llamada epicardio que está formada fundamentalmente por células epiteliales, una capa intermedia de células musculares cardiacas o cardiomiocitos que constituyen el miocardio, y una capa interna de tejido endotelial y conectivo que forma el revestimiento interno de las cavidades del corazón y se conoce como endocardio.

Los cardiomiocitos son las células encargadas de la contracción cardiaca, que permite el bombeo de sangre a los tejidos. Estas células ocupan aproximadamente el 75% del volumen total del corazón, pero constituyen tan solo el 30% de las células de este órgano (Haque, Wang, 2017). Para que se produzca la contracción del cardiomiocito es necesario que esta célula sufra un proceso conocido como acoplamiento excitación-contracción, iniciado con una despolarización celular que permite un flujo de iones con el espacio extracelular, y que concluye con la contracción coordinada del corazón (Bers, 2002).

Para que tenga lugar la contracción cardiaca, la despolarización iniciada en un foco concreto tiene que transmitirse por todo el corazón. (Lee, Pickham, 2016). El inicio de la contracción cardiaca se produce gracias a la acción de las células marcapasos del nodo seno-auricular (SA), localizado en la aurícula derecha. Estas células cuentan con una capacidad auto-excitatoria, pudiendo lanzar potenciales de acción de forma espontánea sin necesidad de recibir ningún estímulo. En esta despolarización participan una serie de canales iónicos, provocando una alteración del potencial de membrana que se transmite a las células adyacentes mediante uniones comunicantes a través de las proteínas conexinas. La señal se transmite a través de las fibras comunicantes hasta el nodo aurículo-ventricular (AV), en el que se produce una ralentización de la señal que permite que primero tenga lugar la contracción auricular y el llenado de los ventrículos. A continuación, esta despolarización se transmite desde el nodo AV por el haz de His y las fibras de Purkinje hasta las paredes ventriculares, lo que permite la contracción de ambos ventrículos (Kaese, Verheule, 2012).

A nivel molecular, la despolarización ventricular que permite la contracción es un proceso regulado por la apertura y cierre de canales iónicos, que provocan variaciones en el flujo de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Mohrmann, 2007). En condiciones de reposo, la concentración de K^+ en el interior celular es superior a la observada en el espacio extracelular, mientras que las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} son inferiores en el interior del cardiomiocito, marcando un potencial de membrana en reposo de

-90 mV. En el inicio de la contracción cardíaca se alcanza un potencial de membrana umbral (-65 mV) que provoca la apertura de canales de Na^+ , iniciándose una entrada masiva de este ion disparando así el potencial de acción. Una vez alcanza el valor máximo, estos canales se cierran y se produce la apertura de canales lentos de Ca^{2+} y K^+ , que mantienen el potencial de membrana en una fase de meseta. Finalmente, se produce el cierre de los canales de Ca^{2+} y la apertura de canales rápidos de K^+ , lo que genera una hiperpolarización, iniciando una fase refractaria hasta alcanzar el potencial en reposo (**Figura 1**) (Kaese, Verheule, 2012).

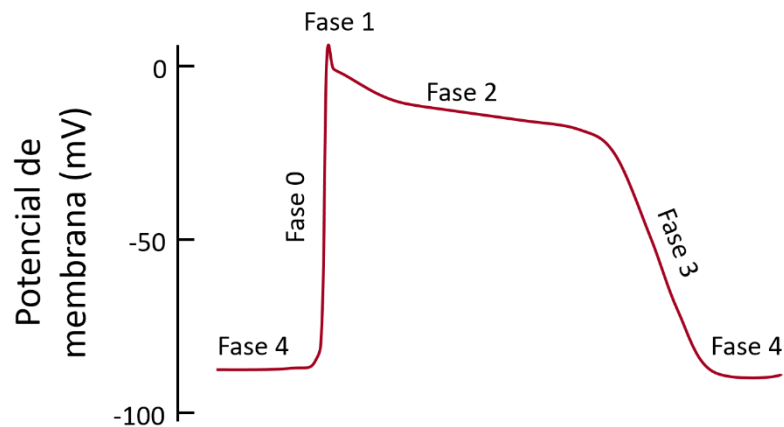


Figura 1. Esquema representativo de un ciclo de despolarización cardíaca. El flujo de iones generado por la apertura de canales iónicos permite la contracción muscular. La fase 0 se inicia con una rápida despolarización como consecuencia de la apertura de canales de Na^+ , que se cierran en la fase 1 en la que se produce la apertura de canales de Ca^{2+} y K^+ iniciando la fase 2 o de meseta, que mantiene el potencial de membrana elevado. La fase 3 provoca una rápida repolarización por el cierre de canales de Ca^{2+} y mayor apertura de canales de K^+ . Finalmente, la fase 4 es una fase refractaria en la que todos los canales están cerrados hasta iniciar un nuevo ciclo de despolarización.

La apertura de canales lentos de Ca^{2+} tipo L provoca la entrada de Ca^{2+} al citosol, lo que genera un aumento de su concentración intracelular, dando inicio a la contracción muscular. Se inicia entonces un mecanismo conocido como liberación de calcio inducida por calcio (*calcium induced calcium release*) en el que se produce una liberación masiva del Ca^{2+} almacenado en el interior del retículo sarcoplásmico (RS) como consecuencia de la activación por Ca^{2+} del canal receptor de rianodina (RyR). A continuación, se activan una serie de mecanismos que permiten la relajación muscular a través de la reducción de los niveles de Ca^{2+} intracelular. Para ello, existen distintas proteínas como la bomba ATPasa del retículo sarcoplásmico SERCA2a que permite recaptar el Ca^{2+} y almacenarlo de nuevo en el RS, o el intercambiador Na^+ - Ca^{2+} NCX, que expulsa el Ca^{2+} al exterior celular, mediante un mecanismo de antiporte con Na^+ (**Figura 2**) (Bers, 2002).

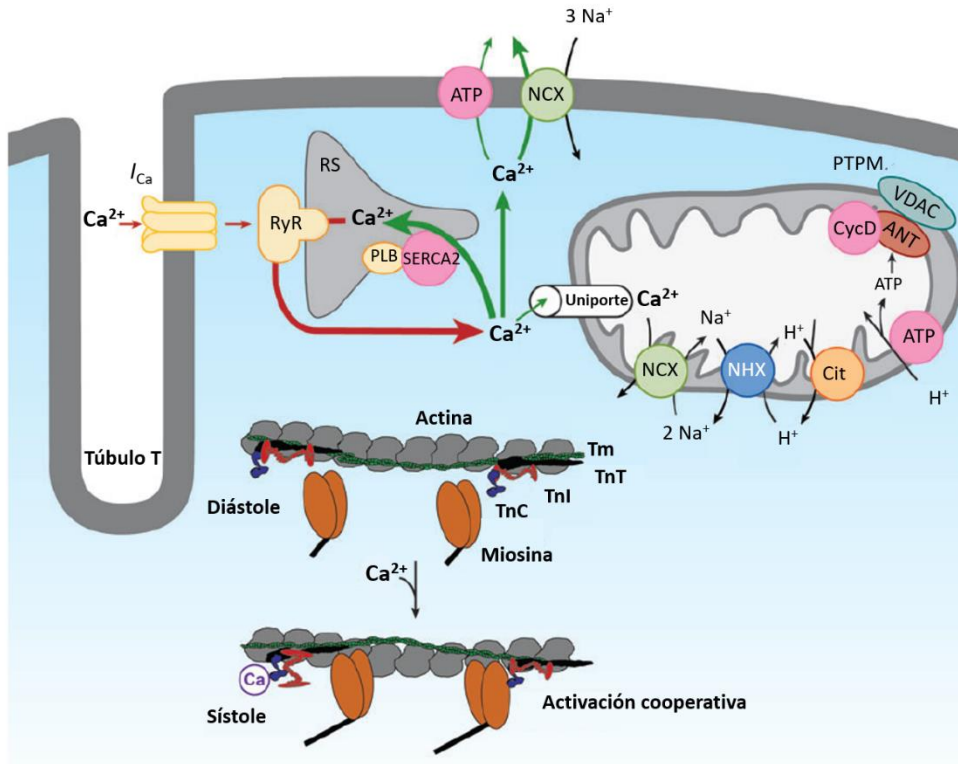


Figura 2. Esquema de la contracción cardíaca regulada por Ca^{2+} . La apertura de canales de Ca^{2+} tipo L en el cardiomiocito provoca la entrada de Ca^{2+} al interior celular, donde es captado por RyR iniciando la liberación del Ca^{2+} almacenado en el RS al espacio intracelular. El Ca^{2+} es reconocido por la troponina C (TnC), iniciando un cambio conformacional de esta proteína que se transmite a la tropomiosina (Tm) a través del dominio TnT o troponina T, quedando expuesta la actina. Se produce entonces la unión entre actina y miosina, que a través de la hidrólisis del ATP permite el desplazamiento de los filamentos de actina dando lugar al proceso de contracción muscular. Una vez concluye este proceso, se produce la activación de distintos mecanismos que permiten reducir la concentración del Ca^{2+} intracelular, bien provocando su salida al exterior celular (NCX) o almacenándolo de nuevo en compartimentos celulares como la mitocondria o el RS (SERCA2a). Figura adaptada de (Bers, 2008).

Las células del músculo cardíaco presentan una organización interna en forma de miofibrillas, que son las encargadas de producir la captación de Ca^{2+} y la contracción muscular. Estas miofibrillas están formadas por la agrupación de sarcómeros, que constituyen la unidad contráctil del músculo, formados por cinco proteínas fundamentales: titina, actina, miosina, troponina (Tn) y tropomiosina (Tm). En cuanto a su disposición en el sarcómero, la miosina constituye la región central conocida como banda o línea A, y a ambos lados se organizan los filamentos de actina, asociados a Tn y Tm, conformando las bandas I que se anclan a los discos Z, constituidos por titina, que delimitan el sarcómero y determinan su tamaño.

La contracción cardíaca se produce por la interacción entre la actina y la miosina, de tal manera que se promueve un desplazamiento de los filamentos de actina que genera un acortamiento de los sarcómeros. En situación de reposo, la interacción entre actina y miosina está bloqueada por

impedimento estérico por el complejo Tn-Tm. Sin embargo, la despolarización provocada por el potencial de acción permite un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, captado por la Tn, generando un cambio conformacional en el complejo Tn-Tm que libera el sitio de interacción entre actina y miosina, permitiendo la contracción muscular (**Figura 2**) (Sweeney, Hammers, 2018).

1.2. Patologías cardíacas

Las enfermedades cardiovasculares se definen como el conjunto de patologías asociadas a trastornos del corazón o de los vasos sanguíneos, y según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), suponen la principal causa de mortalidad en todo el mundo. Dentro de este tipo de enfermedades cardiovasculares se engloban las cardiomiopatías, que se definen como alteraciones del miocardio asociadas con algún tipo de disfunción cardíaca (McKenna, Maron & Thiene, 2017). Esto incluye no solo a aquellas enfermedades que provocan una alteración visible en el miocardio, sino también a las canalopatías y arritmias, que provocan una alteración en la función eléctrica del cardiomiocito. Una de las principales complicaciones que presentan las cardiomiopatías es el desarrollo de fallo cardíaco (FC), definido como una patología causada por una capacidad insuficiente del corazón para bombear sangre en respuesta a una demanda sistémica (Heineke, Molkentin, 2006).

Las cardiomiopatías pueden tener un origen muy diverso, distinguiéndose: i) las cardiomiopatías primarias en las que el defecto se encuentra únicamente o de forma predominante en el corazón (McKenna, Maron & Thiene, 2017), pudiendo ser genéticas (cardiomiopatías hipertróficas o displasia arritmogénica del ventrículo derecho, entre otras), adquiridas (miocarditis), o de origen mixto (cardiomiopatías dilatada y restrictiva) (Brieler, Breeden & Tucker, 2017), y ii) las cardiomiopatías secundarias, que aparecen como consecuencia de una enfermedad multisistémica (McKenna, Maron & Thiene, 2017). Dentro de este grupo aparecen enfermedades de etiología muy diferente, con patologías del sistema endocrino como la diabetes, enfermedades neuromusculares como la distrofia muscular de Duchenne, o enfermedades metabólicas como defectos en la β -oxidación de los ácidos grasos o acidurias orgánicas.

1.2.1. Cardiomiopatías de remodelado estructural

Este grupo de enfermedades cardíacas incluye aquellas cardiomiopatías en las cuales se produce una alteración morfológica y/o funcional del miocardio (Sisakian, 2014). Dentro de éstas, las patologías más frecuentes son la hipertrofia cardíaca y la cardiomiopatía dilatada.

La hipertrofia cardíaca (CH), se caracteriza por un incremento en la masa del corazón y grosor de la pared ventricular acompañado de una reducción del volumen de los ventrículos. A nivel

celular, el cardiomiocito experimenta un incremento hipetrófico concéntrico. Como cardiomiopatía primaria de origen genético, se produce fundamentalmente por mutaciones en proteínas sarcoméricas (Harvey, Leinwand, 2011). En cuanto a su origen como enfermedad adquirida o secundaria, normalmente comienza como un mecanismo compensatorio ante un estímulo patológico, el cual termina provocando la activación de distintas rutas de señalización (Heineke, Molckentin, 2006) que acaban provocando el establecimiento de la CH. Clínicamente, la CH se caracteriza por la presencia de fibrosis intersticial, una desorganización de las miofibrillas musculares y un remodelado del miocardio que terminan provocando una alteración en la función del ventrículo izquierdo, pudiendo desembocar en FC (Modesto, Sengupta, 2014).

Por otro lado, la cardiomiopatía dilatada (DCM) presenta una reducción del grosor de las paredes cardíacas y un aumento del volumen de las cavidades ventriculares. Este remodelado se produce por una serie de cambios a nivel del cardiomiocito que provocan un incremento en su tamaño dando lugar a una célula de morfología alargada (Heineke, Molckentin, 2006). Puede presentar tanto un origen genético como adquirido o secundario, y además supone un punto común en el que desembocan muchas otras cardiomiopatías, incluidas la CH. Clínicamente la DCM cursa con una depresión de la función sistólica acompañada del desarrollo de fibrosis intersticial y arritmias, lo que provoca una disminución de la fracción de eyección (FE) que eventualmente termina en FC (Sisakian, 2014).

1.2.2. Alteraciones electrofisiológicas

Se consideran arritmias aquellas cardiomiopatías provocadas por desórdenes en la actividad eléctrica del corazón, con o sin afectación en las funciones sistólica y diastólica, y que se deben a canalopatías o alteraciones relacionadas con la función de canales iónicos (McKenna, Maron & Thiene, 2017). En función de las cavidades que presentan la alteración electrofisiológica, se distinguen arritmias auriculares, como la fibrilación auricular o el aleteo auricular, o ventriculares, entre las que aparecen enfermedades como el síndrome del QT largo.

El correcto diagnóstico de las arritmias se determina mediante la realización de un electrocardiograma, que determina la actividad eléctrica del corazón a lo largo del tiempo, permitiendo diferenciar los ciclos de contracción y relajación. Para ello, se definen varias ondas que indicarían las distintas fases de la contracción cardíaca. En primer lugar, la onda P determina el inicio de la despolarización auricular, la onda QRS marca la despolarización ventricular, y por último la onda T indica la repolarización ventricular. Entre estas ondas se definen distintos intervalos (**Figura 3**) que reflejan el tiempo de transmisión del impulso eléctrico en el corazón.

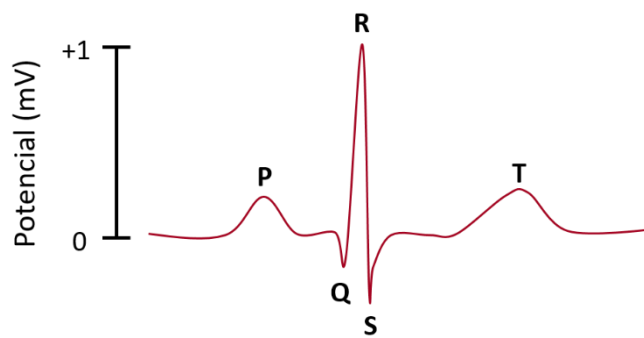


Figura 3. Representación gráfica de un electrocardiograma. Las ondas P, QRS y T muestran la actividad eléctrica del corazón. La intensidad de estas ondas y la distancia entre intervalos permiten el correcto diagnóstico de las arritmias. El intervalo PR determina la despolarización auricular y el retraso en el nodo AV, permitiendo identificar anomalías auriculares o a nivel del nodo AV. El intervalo QT marca el tiempo desde la despolarización ventricular hasta su repolarización completa, y permite identificar anomalías ventriculares.

El síndrome del QT largo es una enfermedad arritmogénica causada por una prolongación del intervalo QT o tiempo de repolarización ventricular. Esta enfermedad se produce por mutaciones o mecanismos secundarios que provocan una alteración en la función de canales de K^+ (pérdida de función) o de Na^+ (ganancia de función), lo que provocaría retrasos en la repolarización o una despolarización prolongada, respectivamente. Clínicamente, esta enfermedad puede provocar muerte súbita o el desarrollo de FC (Singh, Morin & Link, 2019).

Una de las complicaciones más frecuentes que presenta el síndrome del QT largo es la presencia de latidos ectópicos ventriculares, síndrome arritmogénico común a otras patologías. Estas alteraciones se caracterizan por desencadenar una despolarización espontánea en una región cardíaca que no tiene capacidad autoexcitatoria, dando lugar a un nuevo ciclo sistólico que puede provocar alteraciones en el ritmo cardíaco (Sabir et al., 2008). Así, en patologías con una fase de repolarización prolongada como el síndrome del QT largo se pueden desencadenar estos potenciales de acción como consecuencia de una reactivación de los canales de Ca^{2+} tipo L, o bien por una alteración en la función de proteínas implicadas en el manejo del Ca^{2+} a nivel intracelular, provocando su liberación de los almacenes intracelulares iniciando un ciclo de contracción ectópico.

2. Acidemia propiónica

La acidemia propiónica (AP; MIM #606054) es una enfermedad metabólica hereditaria o EMH, que se definen como enfermedades genéticas causadas por defectos en genes que codifican frecuentemente para enzimas, pero también para transportadores, factores de transcripción, etc., implicados en diferentes rutas metabólicas lo que conduce a la alteración de la homeostasis celular (El-Hattab, 2015, Morava et al., 2015). La AP se clasifica dentro del grupo de los desórdenes del metabolismo intermediario o patologías de intoxicación, provocadas por la acumulación de metabolitos intermedios próximos al bloqueo de la ruta afectada, en este caso, la ruta oxidativa del propionato.

La AP fue definida por primera vez en 1971 como un defecto en la enzima propionil-CoA carboxilasa (PCC; E.C. 6.4.1.3) gracias a los estudios realizados por Hsia, Scully & Rosenberg, 1971 sobre fibroblastos de piel obtenidos de un paciente previamente diagnosticado de una hiperglicinemia cetósica (Childs et al., 1961).

La propionil-CoA carboxilasa es una enzima mitocondrial, dependiente del cofactor biotina, que constituye un dodecámero formado por 6 subunidades α y 6 subunidades β . Esta enzima participa en el metabolismo de los aminoácidos isoleucina, valina, treonina y metionina, ácidos grasos de cadena impar y la cadena lateral del colesterol, catalizando la carboxilación del propionil-CoA a D-metilmalonil-CoA, que finalmente entra al ciclo de Krebs en forma de succinil-CoA, por lo que constituye una importante vía anaplerótica. La proteína forma una estructura en la que las subunidades β se localizan en un núcleo interno agrupadas en forma de 3 dímeros, mientras que las subunidades α se localizan alrededor de este núcleo interno en forma de monómeros (Figura 4) (Huang, C. S. et al., 2010).

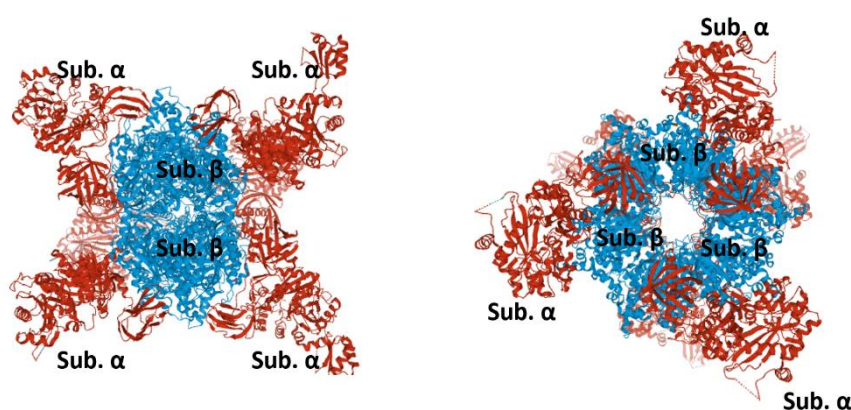


Figura 4. Estructura de la holoenzima propionil-CoA carboxilasa (PCC). Se muestran distintas vistas del cristal de la proteína PCC obtenida de *Ruegeria pomeroyi* (código de acceso en PDB: 3n6r) (Huang et al. 2010), reflejando la disposición de las subunidades β (en azul) en el núcleo interno de la proteína, con las subunidades α (en rojo) localizadas en la región externa.

Actualmente, el diagnóstico de la AP se realiza mediante la detección de metabolitos derivados del propionato como el 3-OH-propionato, metilcitrato y propionilglicina en muestras de orina mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Los avances en el cribado neonatal permiten diagnosticar individuos asintomáticos a través de la identificación de propionilcarnitina mediante la tecnología de espectrometría de masas en tándem a partir de muestras de sangre de individuos recién nacidos. Finalmente, el diagnóstico se completa a través de la medición de la actividad enzimática de la PCC en células de pacientes (principalmente leucocitos y fibroblastos de piel) y mediante un análisis genético para la identificación de mutaciones en los genes *PCCA* (OMIM 232000), y *PCCB* (OMIM 232050), que codifican para las subunidades α y β de la enzima, respectivamente (Richard et al., 2015).

La AP se hereda con carácter autosómico recesivo y se clasifica dentro de las llamadas enfermedades raras por su baja prevalencia, aunque es una de las acidemias orgánicas más frecuentes con una incidencia global de un 1 caso por cada 100.000-150.000 nuevos nacimientos.

2.1. Fisiopatología y presentación clínica

La PCC es una proteína de expresión fundamentalmente hepática. No obstante, la AP no desarrolla una alteración exclusivamente a nivel del hígado, sino que se trata de una enfermedad multisistémica. Clínicamente, la enfermedad puede presentarse de forma neonatal, que suele suponer una afección más severa que cursa con cetoacidosis, letargia, encefalopatías, convulsiones, etc., y que puede provocar la muerte del individuo si no se trata de forma adecuada (Haijes, Jans et al., 2019).

Aparte, existe una forma más suave de la enfermedad, que se manifiesta normalmente como consecuencia de un incremento en el catabolismo proteico desencadenado por una situación anómala (infecciones por patógenos, ejercicio intenso, ayuno prolongado, etc.). En este caso, la aparición y desarrollo de los síntomas suele ser progresiva, con afectación a nivel de distintos órganos como el músculo esquelético (hipotonía), páncreas (pancreatitis), o hígado (hepatomegalia, cirrosis), entre otros. Una de las complicaciones más severas en AP tiene lugar a nivel neurológico, donde la sintomatología más común incluye desórdenes del movimiento como distonías y coreatetosis provocadas por una degeneración a nivel de los ganglios basales, retraso del desarrollo y defectos cognitivos (Schreiber et al., 2012). En ocasiones se observan también problemas psiquiátricos y del espectro autista (de la Bâtie et al., 2018). Los pacientes de AP presentan también complicaciones cardíacas, explicadas más en detalle en el apartado 2.1.1.

Uno de los mecanismos fisiopatológicos que contribuye a las alteraciones observadas en AP se basa en la presencia de una disfunción mitocondrial secundaria y el incremento en la producción

de especies reactivas de oxígeno (ROS). La mitocondria constituye un orgánulo fundamental en la célula, cuya función principal es la producción de energía en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa. Además, la mitocondria participa en la regulación de la señalización mediada por Ca^{2+} , metabolismo de biomoléculas como ácidos grasos, control de la muerte celular, regulación de la producción y señales mediadas por ROS, etc. La disfunción mitocondrial ha sido identificada como un proceso fundamental en distintas enfermedades, incluyendo patologías cardiovasculares como el FC (Zhou, Tian, 2018) o enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (Joshi, Mochly-Rosen, 2018).

En AP, la disfunción mitocondrial secundaria se produce como consecuencia del bloqueo en la PCC que genera una acumulación de metabolitos tóxicos (propionato y derivados de su oxidación alternativa) que provocan la inhibición de enzimas implicadas en vías glucolíticas, del ciclo de Krebs o ciclo de la urea. El propionil-CoA provoca la inhibición de enzimas como la piruvato deshidrogenasa (PDH), la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α CGDH) o el complejo III de la cadena de transporte de electrones (CTE) (Figura 5), que ha sido confirmado a partir de estudios sobre biopsias de músculo esquelético de pacientes de AP (Schwab et al., 2006) y en un modelo murino de la enfermedad (Gallego-Villar et al., 2016). Al mismo tiempo, se ha comprobado que en tejidos como el hígado o el corazón se produce una reducción en la cantidad de proteína y en la actividad de distintos complejos de la CTE, lo que contribuye también al desarrollo de la fisiopatología (de Keyzer et al., 2009, Gallego-Villar et al., 2016). El propionil-CoA también produce la inhibición de la enzima succinil-CoA sintetasa (SCS), lo que genera una depleción del mtDNA (Brock, Buckel, 2004). En relación al ciclo de la urea, la acumulación de propionil-CoA inhibe la acción de la N-acetilglutamato sintasa (NAGS), lo que produce hiperamonemia, de especial relevancia a nivel del sistema nervioso central (SNC).

Un incremento en la producción de ROS, como consecuencia de la alteración en la función de los complejos de la CTE que produce una variación en el potencial de membrana mitocondrial, contribuiría a la alteración de la función de este orgánulo. El incremento en la producción de ROS (Figura 5), puede provocar a su vez daño a DNA, lípidos o proteínas alterando su función y contribuyendo a la patología. En concordancia con esta hipótesis, se ha detectado una disfunción mitocondrial e incremento en la producción de ROS tanto en células de pacientes (Gallego-Villar et al., 2013) como en el modelo murino de AP (Gallego-Villar et al., 2016).

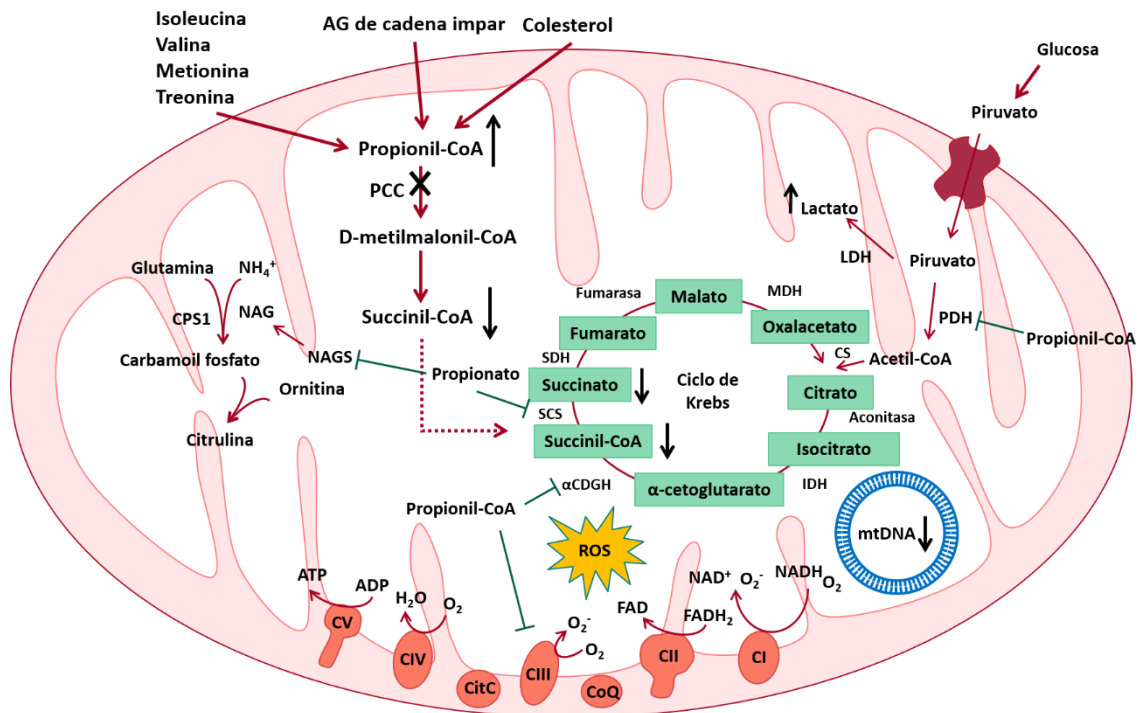


Figura 5. Fisiopatología en AP: disfunción mitocondrial, ROS y papel del propionato. El defecto de la PCC provoca la acumulación de propionil-CoA que ejerce un efecto inhibitorio sobre distintas enzimas mitocondriales. Este bloqueo en la acción de varias proteínas se traduce en una disfunción mitocondrial como consecuencia de un desbalance en las rutas metabólicas en que participa, así como una caída en la obtención de energía en forma de ATP, lo que provoca un aumento en la producción de ROS, provocando daño a proteínas, lípidos y DNA, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad. PCC: propionil-CoA carboxilasa; AG: ácidos grasos; PDH: piruvato deshidrogenasa; LDH: lactato deshidrogenasa; CS: citrato sintasa; IDH: isocitrato deshidrogenasa; αCDGH: α-cetoglutarato deshidrogenasa; SCS: succinil-CoA sintetasa; SDH: succinato deshidrogenasa; NAGS: N-acetilglutamato sintasa; NAG: N-acetilglutamato; CPS1: carbamoil fosfato sintetasa 1; CI-CV: complejos I a V de la CTE; CoQ: Coenzima Q₁₀; CitC: citocromo C

2.1.1. Cardiomiopatías en AP

Las complicaciones a nivel cardíaco en AP suponen una de las principales causas de mortalidad de los pacientes que sobreviven a las crisis metabólicas en el periodo neonatal. Las alteraciones más frecuentemente observadas incluyen el desarrollo de DCM que finalmente desemboca en FC, o una prolongación del intervalo QT, dando lugar al síndrome del QT largo adquirido y la presencia de arritmias asociadas como los latidos ventriculares ectópicos y bradicardia, que pueden provocar la muerte de los pacientes por paro cardíaco o muerte súbita (Pena et al., 2012).

En relación a la DCM, los estudios realizados por Romano et al., 2010 indican una prevalencia de esta enfermedad en el 23% de los pacientes de AP. Estos pacientes fueron diagnosticados en su mayoría de forma neonatal, y muestran un desarrollo progresivo de la sintomatología cardíaca. Estos datos presentan una correlación con los mostrados por Kovacevic et al., 2020, donde se identifican pacientes diagnosticados en los primeros meses de nacimiento, desarrollando bien DCM

o bien una alteración en la función cardíaca (diastólica y sistólica). Sin embargo, es importante destacar que el desarrollo de las cardiomiopatías no está asociado a un genotipo concreto o al número de crisis metabólicas sufridas por los pacientes. De hecho, se han reportado casos de pacientes diagnosticados con DCM aislada que posteriormente fueron identificados como pacientes asintomáticos de AP (Laemmle et al., 2014, Riemersma et al., 2017).

Por otro lado, en relación con el síndrome del QT largo adquirido, muy frecuente en los pacientes de AP (Duras, Irdem & Özkaya, 2017), se observa en los estudios realizados por Baumgartner et al., 2007 que el 70% de los pacientes presenta este tipo de arritmias, sintomatología que en ocasiones desarrolla también otras alteraciones como bradicardia o latidos ectópicos ventriculares. Igualmente, existe una correlación entre el desarrollo del síndrome del QT largo adquirido y otras patologías cardíacas como la disfunción ventricular y la DCM (Baumgartner et al., 2007, Kovacevic et al., 2020). En cuanto a la fisiopatología subyacente a estas arritmias, estudios *in vitro* indican que la acumulación de propionato y otros metabolitos tóxicos como la propionilcarnitina y el metilcitrato ejercen no solo un incremento en la duración del potencial de acción, sino también una inhibición de las corrientes lentas de K^+ (I_{ks}), lo que explicaría la prolongación del intervalo QT (Bodi et al., 2016).

2.2. Tratamiento

Actualmente, la AP es una enfermedad para lo que no existe cura, por lo que los tratamientos se centran en paliar la sintomatología, así como en evitar que se desencadenen crisis metabólicas que empeoren el desarrollo de la enfermedad.

En los pacientes neonatales en los que se producen frecuentemente crisis metabólicas, el tratamiento incluye la eliminación de productos tóxicos mediante la hemodiálisis. En general, el tratamiento estándar en la AP está basado en una restricción dietética para evitar el consumo de sustratos propionogénicos, así como en evitar la entrada en estado catabólico y fomentar la ingesta calórica ante situaciones de estrés como infecciones. Asimismo, se recomienda también el consumo de L-carnitina, que facilita la eliminación del propionil-CoA en la orina, o antibióticos como el metronidazol para evitar el crecimiento de las bacterias entéricas de la flora intestinal, que suponen una fuente de propionato para el organismo.

En los casos más severos y difíciles de controlar metabólicamente, se ha propuesto el trasplante hepático como una terapia alternativa a la restricción dietética. Se ha demostrado una mejora significativa de la calidad de vida de los pacientes reportando estudios en los cuales se aprecia una reversión de la cardiomiopatía (Romano et al., 2010) o una mejora de la sintomatología neurológica (Nagao et al., 2013) tras el trasplante. No obstante, este tratamiento cuenta con una serie de

inconvenientes, como pueden ser las complicaciones derivadas de una cirugía, así como la necesidad de llevar a cabo un tratamiento crónico para evitar el rechazo inmunológico. Por último, pese a que ha demostrado ser un tratamiento eficaz en muchos casos, el trasplante hepático solamente corrige el defecto enzimático a nivel del hígado, por lo que el resto de órganos mantendrían una producción constante de metabolitos tóxicos pudiendo contribuir al desarrollo de la sintomatología propia de AP.

Dado que los tratamientos existentes para la AP no consiguen revertir de forma definitiva la enfermedad, se están investigando aproximaciones terapéuticas que corrijan el defecto como pueden ser la terapia génica (Guenzel et al., 2013, Guenzel et al., 2014, Hofherr et al., 2009) y el reemplazo enzimático (Haijes, van Hasselt et al., 2019). Otras terapias en estudio buscan paliar la sintomatología de la enfermedad, como son la terapia anaplerótica (Longo et al., 2017), o el uso de compuestos para combatir las ROS o la disfunción mitocondrial. En este sentido, estudios previos del laboratorio han mostrado la eficacia del uso de antioxidantes, como el tirón, mitoQ, resveratrol y trolox en fibroblastos procedentes de pacientes AP (Gallego-Villar et al., 2014). Asimismo y dado que el mitoQ y resveratrol ya están en uso clínico para otras patologías, nuestro grupo ha analizado el efecto *in vivo* de estos compuestos en el modelo murino de AP, mostrando una reducción en la presencia de biomarcadores de daño oxidativo y de daño cardiaco (Rivera-Barahona et al., 2017).

2.3. Modelos de enfermedad

El desarrollo de diferentes modelos de enfermedad es una de las herramientas fundamentales que nos permiten estudiar la fisiopatología de las enfermedades, así como valorar posibles aproximaciones terapéuticas. En el caso de la AP, contamos tanto con modelos animales como con modelos celulares.

2.3.1. Modelos animales

El primer modelo animal generado para el estudio de AP fue un ratón *knock-out* (KO) para el gen *Pcca* murino, lo que resulta en un fenotipo muy severo que provoca la muerte del animal en las primeras 36 horas tras su nacimiento (Miyazaki et al., 2001). Esto impulsó la búsqueda de modelos alternativos, como es un ratón hipomorfo con el gen *Pcca* murino deleciónado mediante recombinación homóloga reemplazándolo por un gen de resistencia a neomicina, y al que se ha introducido una copia de un transgén que contiene el cDNA del gen *PCCA* humano con la mutación p.A138T, identificada en pacientes y con una actividad residual del 2-4%. Este modelo *Pcca*^{-/-} (A138T) es capaz de sobrevivir hasta la edad adulta, mimetizando las características bioquímicas y clínicas de la enfermedad (Guenzel et al., 2013) y en el que, como se ha comentado, se evidencia una disfunción mitocondrial, aumento de ROS y daño oxidativo en varios tejidos (Gallego-Villar et

al., 2016), siendo esto último revertido en parte mediante el uso de antioxidantes (Rivera-Barahona et al., 2017).

2.3.2. Modelos celulares

El uso de modelos celulares permite hacer una primera aproximación más rápida al estudio de aspectos fundamentales de la fisiopatología de una enfermedad. En AP, estos modelos tradicionalmente han sido obtenidos a partir de células de pacientes, como leucocitos o fibroblastos, y han permitido analizar determinados parámetros como la función mitocondrial, producción de ROS o la funcionalidad y estabilidad de proteínas PCCA y PCCB mutantes (Gallego-Villar et al., 2013, Rivera-Barahona et al., 2018). No obstante, el principal problema de estos modelos es la incapacidad de poder valorar la función celular en órganos menos accesibles y con una función más comprometida, como pueden ser el cerebro o el corazón. En este contexto ha cobrado especial relevancia el desarrollo de las células madre pluripotentes inducidas o iPSC (*induced pluripotent stem cells*). Las iPSC se generan a partir de células diferenciadas obtenidas de un paciente que se someten a un tratamiento con una combinación de factores de transcripción que permite su reprogramación hasta generar una célula madre, con capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular. Actualmente, en el laboratorio contamos con dos modelos de iPSC para AP, procedentes de pacientes deficientes en PCCA (Alonso-Barroso et al., 2017) o PCCB (López-Márquez et al., 2019). Recientemente, la tecnología de edición génica mediante el sistema CRISPR-Cas9 ha abierto la posibilidad de desarrollar nuevos modelos celulares tanto en líneas establecidas como en iPSC, así como la capacidad de revertir mutaciones a un genotipo *wild-type* (WT) para analizar si el efecto observado es causado por la mutación y no por otras causas.

3. miRNAs

Los RNAs no codificantes (ncRNA, *non coding RNA*) incluyen aquellas secuencias de RNA que no se traducen para dar lugar a una proteína pero que igualmente desempeñan funciones cruciales en el organismo. Recientemente han cobrado especial interés los ncRNAs reguladores de la expresión génica, entre los que se encuentran los RNAs no codificantes largos (lncRNAs) y los RNAs interferentes (iRNAs). Estos últimos se caracterizan por tener un tamaño pequeño (de entre 20-25 nucleótidos) y ejercer su acción reguladora en asociación con las proteínas de la familia argonauta (AGO), de la que se distinguen las subfamilias AGO y PIWI. De esta manera, podemos clasificar a los iRNAs por un lado como microRNAs (miRNAs) y RNAs interferentes cortos (siRNAs, *short-interfering RNAs*), que están asociados a la subfamilia AGO, y, por otro lado, los RNAs interferentes asociados a las proteínas PIWI (piRNAs). En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los miRNAs, que constituye la clase de iRNAs más conocida.

3.1. Biogénesis, función y mecanismo de acción de miRNAs

Los miRNAs se definen como secuencias de RNA monocatenarias de pequeño tamaño (21-22 nucleótidos) derivados de transcritos mayores en forma de horquilla, y que participan en el control de la expresión génica inhibiendo la traducción del mRNA diana o promoviendo su degradación.

Con respecto a la biogénesis de los miRNAs, el 50% de ellos se transcribe a partir de regiones policistrónicas que cuentan con su propio promotor, mientras que la mitad restante se localiza en regiones intrónicas o exónicas, de manera que utilizan los promotores de estos genes para regular su expresión. De forma generalizada, estos miRNAs se transcriben a través de un promotor regulado por la RNA polimerasa II (RNA pol II), si bien determinados miRNAs asociados a las regiones repetidas Alu se expresan por acción de la RNA polimerasa III (RNA pol III). Una vez se produce la transcripción, se genera un miRNA primario (pri-miRNA) de un tamaño superior a 1kb, con una estructura en forma de bucle y tallo. Esta estructura es reconocida en el núcleo por el complejo microprocesador, formado por la proteína Drosha (RNasa de tipo III) que requiere la acción como cofactor de la proteína DGCR8 (*DiGeorge Critical Region 8*), dando lugar a un corte que permite la liberación del precursor del miRNA (pre-miRNA), de aproximadamente 70 pares de bases y que mantiene la estructura en forma de bucle y tallo (**Figura 6**) (Kim, V. N., Han & Siomi, 2009, Tétreault, De Guire, 2013). En el caso de los miRNAs codificados por intrones (*mirtron*), este primer paso regulado por el microprocesador no es necesario, dado que en este caso se aprovecha la maquinaria de *splicing* para generar el pre-miRNA (Berezikov et al., 2007).

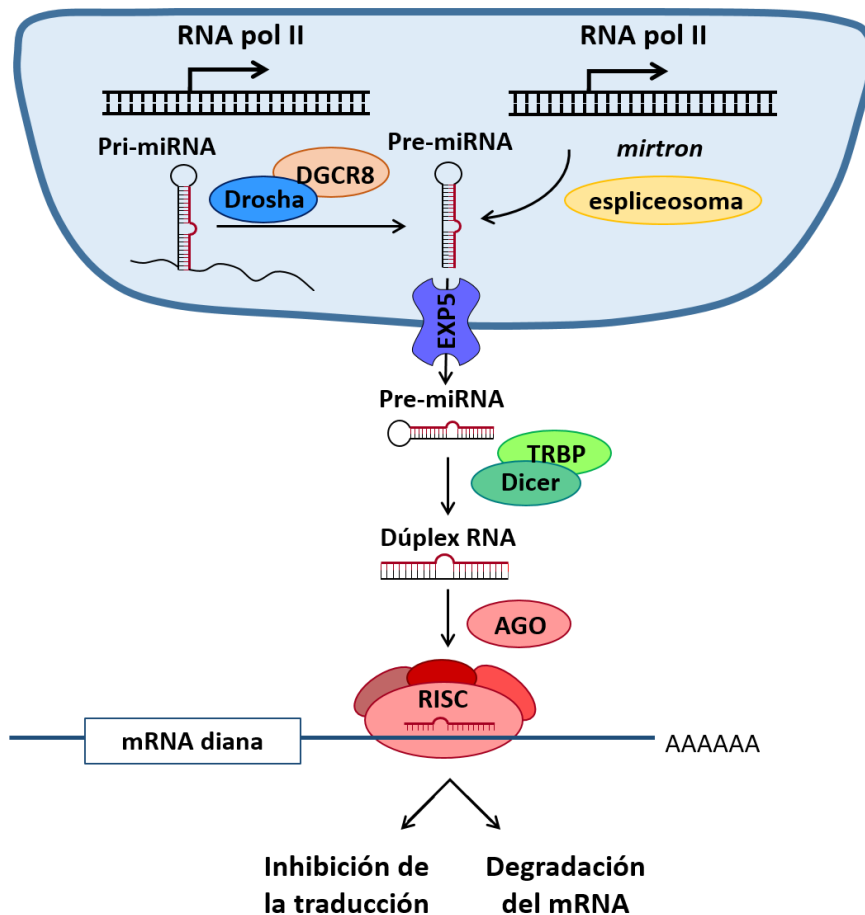


Figura 6. Biogénesis de los miRNAs y mecanismo de acción. Los miRNAs son transcritos mayoritariamente por la RNA pol II para generar los pri-miRNAs, procesados por la acción del complejo Droscha-DGCR8 (microprocesador), salvo en el caso de los *mirtron*, cuyo procesamiento es mediado por la maquinaria de *splicing* (espliceosoma). Esto permite la formación del intermediario pre-miRNA, transportado al citosol por acción de la exportina 5. Una vez en el citosol, el complejo Dicer-TRBP lleva a cabo el procesamiento de este intermediario para formar un dúplex de RNA. A continuación, se produce el reconocimiento de la secuencia líder por las proteínas AGO, que se incorpora al complejo de silenciamiento RISC. Finalmente, este complejo es dirigido por el miRNA hasta el mRNA diana por complementariedad de bases, donde el complejo RISC inhibe la expresión génica a través de una represión de la traducción o mediante la degradación del mRNA. AGO: proteína argonauta; DGCR8: *DiGeorge Critical Region 8*; EXP5: exportina 5; RISC (*RNA-induced silencing complex*); RNA pol II: RNA polimerasa II; TRBP: *TAR RNA binding protein*.

A continuación, este precursor se transporta al citosol por acción de la exportina 5, proteína transportadora dependiente de GTP. Una vez en el citosol, el pre-miRNA es detectado por la proteína Dicer (RNasa tipo III), que junto con la proteína TRBP (*TAR RNA binding protein*) permite el procesamiento de esta molécula para generar un dúplex de RNA que contiene el miRNA y la secuencia complementaria. Posteriormente, se produce el reclutamiento de la proteína AGO que reconoce la cadena del dúplex de menor termoestabilidad en su extremo 5' (Kim, V. N., Han & Siomi, 2009, Tétreault, De Guire, 2013). Este hecho permite la disociación del dúplex de RNA, generando así el miRNA maduro que unido a la proteína AGO da lugar al complejo de silenciamiento

RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Schwarz et al., 2003). Generalmente, la otra secuencia se degrada, aunque se ha descrito que en ocasiones se utiliza para producir otros miRNAs.

El complejo RISC participa en el silenciamiento de la expresión génica promoviendo la inhibición de la traducción o induciendo una degradación del mRNA diana. Esto es posible gracias a la secuencia semilla de los miRNAs, localizada en el extremo 5' entre los nucleótidos 2 y 7 de los miRNAs maduros, que dirige el complejo de silenciamiento hasta la región 3'-UTR del mRNA diana por complementariedad de bases. Tradicionalmente, se postulaba que, en función del tipo de complementariedad que se da entre el miRNA y el mRNA, el efecto producido es diferente, induciendo la degradación del mRNA diana cuando la complementariedad es perfecta, y provocando solo la inhibición de la traducción si no son perfectamente complementarios. No obstante, recientemente se ha puesto de manifiesto que en la mayor parte de los casos se produce una degradación del mRNA, incluso cuando la complementariedad es imperfecta, a través de una desestabilización del mRNA que termina provocando el reclutamiento de enzimas para eliminar la modificación del Cap en 5' y la cola de poliadeninas en el extremo 3', terminando con la participación de exonucleasas que degradan el mRNA diana (Huntzinger, Izaurralde, 2011, Jonas, Izaurralde, 2015).

Una característica fundamental de los miRNAs es que presentan redundancia a nivel genómico, que viene determinada por la capacidad que tienen los miRNAs de unirse, desde un punto de vista predictivo, a la región 3'-UTR de miles de mRNAs diferentes. Biológicamente, esta capacidad se traduce en que un mismo miRNA puede regular multitud de mRNAs diferentes, al mismo tiempo que un único mRNA puede ser regulado por cientos de miRNAs distintos. Gracias a esta propiedad, los miRNAs se han convertido en un elemento clave como reguladores de la expresión génica.

3.2. Implicación de los miRNAs en procesos fisiológicos y patológicos

Los miRNAs desempeñan un papel fundamental en la regulación de procesos biológicos complejos como el control del desarrollo, organogénesis, proliferación, diferenciación y muerte celular. Además, muchos de los miRNAs conocidos presentan una expresión controlada a nivel de promotores específicos de tejido, lo que hace que la presencia de estos miRNAs esté limitada a un órgano concreto para desempeñar una función, habiendo así miRNAs específicos a nivel del SNC que regulan procesos tales como desarrollo neuronal, crecimiento axónico o inflamación (Huang, Y. et al., 2011), miRNAs cardíacos que permiten el mantenimiento de la homeostasis energética sistémica (Grueter et al., 2012) o la función del músculo cardíaco (van Rooij et al., 2009), etc.

Los miRNAs también participan en el control metabólico y obtención de energía a nivel mitocondrial. De esta manera, se ha descrito la implicación de miRNAs en la regulación de los

niveles de las enzimas del ciclo de Krebs (Duarte, Palmeira & Rolo, 2014) o en el control del metabolismo de ácidos grasos y colesterol, como por ejemplo el miR-33 y miR-122 a nivel hepático (Vienberg et al., 2017), o el miR-199a-5p a nivel del corazón (el Azzouzi et al., 2013). En relación a la producción de energía en forma de ATP, existe una regulación por parte de varios miRNAs de los distintos complejos de la CTE (Aschrafi et al., 2008). Finalmente, la dinámica mitocondrial es un aspecto muy relevante para mantener un correcto funcionamiento de este orgánulo, por lo que también encontramos miRNAs encargados de regular este proceso (Wang, J. X. et al., 2011).

Debido a la gran cantidad de procesos fisiológicos que controlan los miRNAs, es necesario que exista una perfecta regulación de su expresión (Gulyaeva, Kushlinskiy, 2016). Por tanto, es completamente lógico que una alteración en los niveles de expresión de los miRNAs pueda conducir al desarrollo de patologías. En este sentido, se ha identificado una desregulación en los niveles de miRNAs en diferentes tipos de cáncer, en los que se puede observar un perfil de expresión específico de los miRNAs, que permite definir un miRNoma propio en cada tipo de tumor (Di Leva, Garofalo & Croce, 2014). Estudios a nivel del SNC han demostrado la implicación de los miRNAs no solo en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Minones-Moyano et al., 2011) o el Alzheimer (Absalon et al., 2013, Jayadev et al., 2013), sino que también se ha postulado la posible implicación de los miRNAs en enfermedades del espectro autista (Fregeac, Colleaux & Nguyen, 2016). Por otra parte, se ha detectado una alteración en los niveles de miRNAs en EMH como la enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (MSUD) (Mersey, Jin & Danner, 2005) o la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (Ozsait et al., 2010).

En el contexto de las cardiomiopatías también se ha descrito una desregulación en los niveles de expresión de los miRNAs que pueden contribuir al desarrollo de la patología, destacando los miRNAs asociados con vías de señalización implicadas en crecimiento hipertrófico, muerte celular por apoptosis o desarrollo de fibrosis (Wang, J. et al., 2016). Debido a la redundancia a nivel genómico de estos miRNAs, es posible que muchos de ellos puedan desempeñar más de un papel en la fisiopatología, de tal manera que serán la combinación entre estímulos recibidos y rutas activadas la que determine la función de estos miRNAs.

Por ejemplo, en patologías como CH y FC, la presencia de un estímulo patológico de forma prolongada en el tiempo puede provocar la sobreactivación de determinadas vías de señalización como la vía de la calcineurina (CnA) o la ruta PI3K-AKT. Este hecho se puede correlacionar con la desregulación de la expresión de miRNAs implicados en remodelado y función cardíaca, que contribuyen al desarrollo de la patología que termina desembocando en una reducción de la capacidad contráctil del corazón (Oliveira-Carvalho, Carvalho & Bocchi, 2013, van Rooij et al., 2006).

En relación a la DCM no isquémica, los últimos estudios indican que se produce una desregulación de miRNAs determinados que establecen un perfil común, en el que se observan miRNAs implicados en hipertrofia, muerte celular y FC, como puede ser los miRNAs miR-1-3p, miR-199a-5p y miR-208a-3p, entre otros (Calderon-Dominguez et al., 2020). Además, las diferentes causas que pueden provocar la DCM (infecciones virales, toxinas, mutaciones genéticas, etc.) pueden causar la alteración de otros miRNAs implicados en otras rutas de señalización, lo que, en conjunto con diversos biomarcadores, puede ayudar a identificar la etiología y comprender las bases moleculares de la enfermedad.

3.3. miRNAs como biomarcadores en enfermedad

En los últimos años ha cobrado especial interés la capacidad de secretar miRNAs por parte de determinados órganos/tejidos en pequeñas microvesículas, exosomas o complejos proteicos de forma que estos miRNAs se mantendrían estables en fluidos corporales como pueden ser el plasma, el suero, la saliva o la orina (Makarova et al., 2015). Biológicamente, la función de estos miRNAs circulantes se traduce en un mecanismo adicional de comunicación celular, similar a una señalización hormonal o paracrina: esto es, los miRNAs secretados por unas células determinadas son captados por células receptoras, en las que podrían regular la expresión de las dianas de estos miRNAs. No obstante, este mecanismo puede contribuir al desarrollo de patologías si las células emisoras presentan algún tipo de alteración en su función (Bayraktar, Van Roosbroeck & Calin, 2017).

Por ello, la principal utilidad de estos miRNAs circulantes radica en su potencial uso como biomarcadores mínimamente invasivos. Se han descrito diferencias en los perfiles de miRNAs en plasma de pacientes con patologías neurodegenerativas (Mushtaq et al., 2016), cáncer (D'Angelo et al., 2016, Sohel, 2020) y enfermedades cardiovasculares como infarto de miocardio (Wang, G. K. et al., 2010), DCM (Toro et al., 2018), CH con fibrosis (Roncarati et al., 2014). De esta manera, estos miRNAs podrían ser utilizados para hacer un correcto diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, e incluso para monitorizar una posible respuesta a tratamientos.

3.4. Aplicaciones terapéuticas de los miRNAs

La desregulación en los niveles de expresión de miRNAs en situaciones patológicas no solamente constituye una herramienta de diagnóstico o seguimiento, sino que también abre la posibilidad de utilizarlos como dianas terapéuticas. Por esta razón, en los últimos años se ha potenciado la investigación en el desarrollo de distintas herramientas que permitan modular los niveles de los miRNAs, divididas fundamentalmente en dos categorías (Figura 7).

3.4.1. Terapias de inhibición de miRNAs

Las terapias de inhibición se emplean para reducir los niveles de miRNAs sobreexpresados en un contexto patológico. Idealmente, los agentes terapéuticos utilizados deben tener alta afinidad y especificidad, estabilidad y baja toxicidad. Dentro de esta herramienta distinguimos dos variantes fundamentales.

En primer lugar, destaca el uso de oligonucleótidos antisentido (AONs), que son pequeñas moléculas de ácidos nucleicos de cadena sencilla modificados químicamente para prevenir su degradación por endo y exonucleasas, así como para mejorar su transporte y propiedades farmacocinéticas. Unos de los primeros AONs dirigidos a miRNAs que se desarrollaron fueron los conocidos como *antagomiRs*, moléculas de RNA conjugadas a colesterol y que tienen como diana un único miRNA, del que son perfectamente complementarios. Posteriormente se desarrollaron los *antimiRs*, constituidos por una secuencia de nucleótidos más corta (en torno a 15 bases) que presentan como modificación química más común la llamada LNA (*locked nucleic acids*), o ácidos nucleicos bloqueados. Estas modificaciones introducen un puente metileno entre las posiciones 3 y 5 del anillo de ribosa, lo que bloquea la estructura y aumenta enormemente la estabilidad del dúplex de RNA generado al unirse a su miRNA diana. Hasta la fecha, esta estrategia es la que ha aportado mejores resultados en investigaciones preclínicas y clínicas (Bernardo et al., 2015). Por esta razón, se han desarrollado los *tiny antimiRs*, que presentan la misma química que los anteriores, solo que en este caso la secuencia es mucho más pequeña (8 nucleótidos) y están dirigidos contra la secuencia semilla de una familia de miRNAs.

En segundo lugar, destaca el uso de las esponjas de miRNA, constituidas por secuencias de RNA en las que se incluyen múltiples sitios de unión para uno o varios miRNAs. Por tanto, esta secuencia actúa como un competidor junto con el mRNA diana por la unión de los miRNAs, lo que permite modular la expresión de los mRNAs diana a través de un “secuestro” de los miRNAs (Bernardo et al., 2015).

Finalmente, existen alternativas dentro de la terapia con AONs como los *blockmiRs*, dirigidos contra la región 3'-UTR a la que se une un miRNA concreto, de tal manera que se enmascara esta secuencia y las regiones adyacentes. No obstante, este efecto solamente se produce sobre un mRNA, de tal manera que el miRNA podría seguir modulando los niveles de otras dianas. (Bernardo et al., 2015, van Rooij, Kauppinen, 2014). Estas estrategias se muestran en la **Figura 7**.

3.4.2. Terapias de sobreexpresión

Este tipo de aproximaciones terapéuticas se basan en promover la expresión de un miRNA cuyos niveles están reducidos en un contexto fisiopatológico concreto. Para ello, la aplicación más utilizada incluye el uso de los miRNA-*mimics* (Figura 7), oligonucleótidos sintéticos de doble cadena que utilizan la maquinaria celular para formar un miRNA maduro. En relación a su composición, la secuencia guía es idéntica a la secuencia del miRNA diana, mientras que la cadena pasajera posee una serie de modificaciones químicas y de secuencia que impiden su unión al complejo RISC (van Rooij, Kauppinen, 2014). No obstante, esta estrategia cuenta con una serie de inconvenientes. Por ejemplo, la necesidad de ser reconocido por las proteínas AGO impide que se puedan introducir determinadas modificaciones químicas para mejorar su estabilidad y bloquear su degradación por nucleasas. Otro problema importante es regular correctamente los niveles de expresión, de forma que esta no aumente por encima de los niveles fisiológicos normales. Por último, es necesario desarrollar mecanismos de distribución específicos de tejido para los miRNA-*mimics*, de tal manera que se evite el desarrollo de *off-targets*.

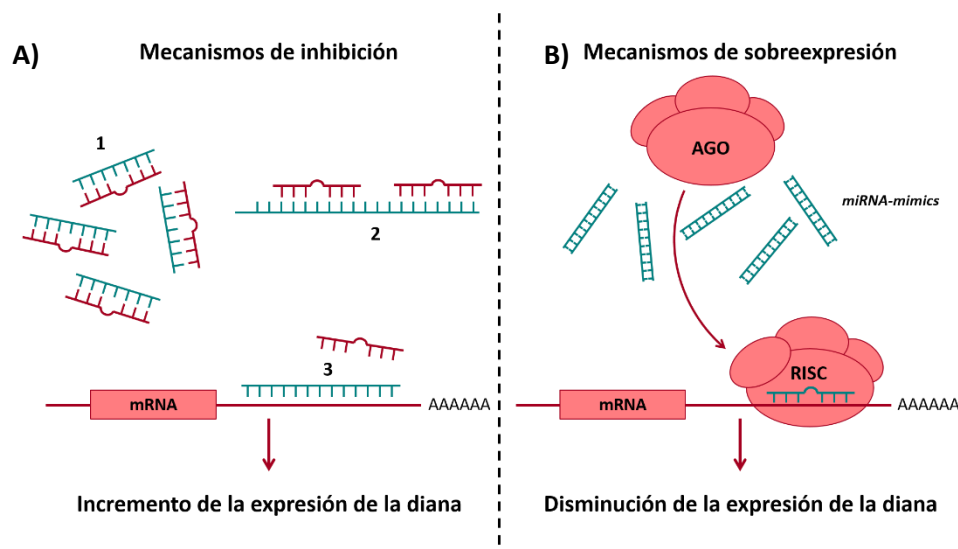


Figura 7. Principales estrategias terapéuticas para modular los niveles de los miRNAs. Existen diferentes aproximaciones que se reflejan en verde mientras que los elementos propios de la célula se muestran en rojo. Los mecanismos de inhibición (A) incluyen el uso de AONs (1) complementarios al miRNA diana, de forma que se unen a éstos y bloquean su acción; las esponjas de RNA (2), grandes secuencias de RNA que contienen múltiples sitios de unión para los miRNAs, de forma que compiten con el mRNA diana y regulan en parte la acción de los miRNAs; y los *blockmiRs* (3), otra variante de AONs que en este caso se unen a la región 3'-UTR del mRNA diana, impidiendo así la unión del miRNA. Los mecanismos de sobreexpresión (B) generalmente implican la acción de los *miRNAs-mimics*, moléculas de RNA de doble cadena que mimetizan la acción del miRNA endógeno, formando el complejo RISC para reprimir la expresión del mRNA diana. AGO: proteína argonauta, AONs: oligonucleótidos antisentido; RISC (*RNA-induced silencing complex*).

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este trabajo ha estado centrado en el estudio de las bases moleculares y mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la sintomatología cardíaca de la acidemia propiónica, así como el ensayo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

Para ello, se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudio de la fisiopatología cardíaca en el modelo murino de acidemia propiónica.
2. Caracterización del papel de miRNAs potencialmente implicados en el desarrollo de las alteraciones cardíacas de acidemia propiónica.
3. Estudio del efecto del propionato en cardiomiocitos.
4. Análisis del potencial terapéutico de la modulación de miRNAs y el fármaco bezafibrato en el modelo murino de acidemia propiónica.
5. Generación del control isogénico de una línea de iPSC derivada de un paciente AP mediante edición génica con CRISPR-Cas9 para futuros estudios fisiopatológicos tras la diferenciación a cardiomiocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Modelo murino de AP

Para la realización de este trabajo contamos con el modelo murino *Pcca*^{-/-} (A138T) (Guenzel et al., 2013), en el cual un fragmento de aproximadamente 2 kb del gen *Pcca* endógeno es reemplazado por el gen de resistencia a neomicina, mediante un proceso de recombinación homóloga (Miyazaki et al., 2001). Al mismo tiempo, dicho modelo cuenta con una inserción aleatoria de una construcción que posee el cDNA del gen *PCCA* humano con la mutación p.A138T, descrita con anterioridad (Desviat et al., 2004, Ugarte et al., 1999) y que genera un fenotipo suave de la enfermedad, permitiendo que el ratón alcance la edad adulta mimetizando las características clínicas y bioquímicas propias de AP. Este modelo está generado sobre el fondo genético FVB.

Todos los animales fueron mantenidos siguiendo las directrices de la Ley Española de Protección Animal, manteniendo los ratones en un ambiente libre de patógenos, a temperatura y humedad controladas, y sometidos a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas de duración cada uno, comprendidos entre las 8:00-20:00 horas y las 20:00-8:00 horas, respectivamente. En cuanto a su mantenimiento, los ratones se agruparon en un máximo de 5 animales por cubeta, con comida y bebida *ad libitum*. Todos los experimentos realizados en este trabajo han sido aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid (con referencia CEI 963-A026), y por el Departamento Regional de Medioambiente de la Comunidad de Madrid, (con referencia PROEX 22/14 y PROEX 194/2019).

1.2. Líneas celulares

El efecto de la sobreexpresión de miRNAs se llevó a cabo en células de hepatoma humano (Hep3B) y en cardiomiocitos transformados de origen murino (HL-1). Por otra parte, para analizar el efecto del propionato se utilizó la línea de cardiomiocitos HL-1.

Con respecto al ensayo de edición génica mediante CRISPR-Cas9, se utilizó una línea iPSC con defectos en el gen *PCCB*, previamente generada y caracterizada en el laboratorio (López-Márquez et al., 2019).

1.3. Muestras de plasma de controles y pacientes de AP

En este trabajo se han utilizado muestras de plasma procedentes de individuos control y de pacientes de AP. Los pacientes de AP fueron diagnosticados después de un estudio genético y bioquímico llevado a cabo en el Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM, Madrid).

Todas las muestras de plasma procedentes de los pacientes de AP se corresponden con remanentes de muestras utilizadas bien para el diagnóstico de la enfermedad, bien para el seguimiento de la misma, y después de haber recopilado el correspondiente consentimiento informado. De las 10 muestras de plasma de pacientes de AP utilizadas en este estudio, nueve de ellas proceden de pacientes con defectos en *PCCB*, y una de un paciente con mutaciones en *PCCA*. Con respecto a las muestras de plasma de individuos control, todas ellas fueron adquiridas a la compañía Sera Lab Ltd (<http://www.seralab.co.uk>), laboratorio que obtiene muestras de plasma procedentes de donantes anónimos.

1.4. Anticuerpos

En la siguiente tabla se recogen todos los anticuerpos utilizados en los diferentes experimentos para la detección de proteínas, así como las condiciones de uso de los mismos.

Tabla 1: Anticuerpos

Anticuerpo	Proteína/Diana	Especie, Descripción	Uso, Dilución	Referencia	Casa Comercial
Anti- α actina	α actina del músculo liso	Ratón, mAb	IF, 1/400	A5228	Sigma-Aldrich
Anti-ATP5G1	Subunidad C1 del complejo de la ATP sintasa F(0)	Conejo, mAb	WB, 1/1000	ab180149	Abcam
Anti-CASP3	Caspasa 3	Conejo, pAb	WB, 1/1000	9662	Cell Signaling
Anti-CASP9	Caspasa 9	Conejo, pAb	WB, 1/1000	9504	Cell Signaling
Anti- β catenina	β -catenina	Ratón, mAb	WB, 1/2000	610153	BD Biosciences
Anti-CPT1	Carnitina O-palmitoiltransferasa	Conejo, mAb	RPPma, 1/100	sc-20670	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ENO1	α -enolasa	Conejo, mAb	RPPma, 1/200	AM2192b-ev	Abgent
Anti-ETFA	Subunidad α de la proteína transportadora de electrones	Ratón, mAb	RPPma, 1/100	Ab110316	Abcam
Anti- β f1	Sub β 1 ATPasa	Ratón, mAb	RPPma 1/100	(Aldea et al., 2011)	Lab J.M. Cuezva
Anti- α fetoproteína	α fetoproteína	Conejo, mAb	IF, 1/400	A0009	Dako
anti-fosfo JNK	JNK (Thr183/Tyr185)	Conejo, pAb	WB, 1/1000	9251	Cell Signaling
anti-fosfo p38	p38 (Thr180/Tyr182)	Conejo, pAb	WB, 1/1000	9211	Cell Signaling
Anti-G6PDH	Glucosa 6P deshidrogenasa	Conejo, mAb	RPPma, 1/100	PA1-84814	Thermo Scientific
Anti-GAPDH	Gliceraldehído 3P deshidrogenasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/250	(Santacatterina et al., 2015)	Lab. J.M. Cuezva
Anti-GAPDH (65C)	Gilceraldehido 3P deshidrogenasa	Ratón, mAb	WB, 1/5000	ab8245	Abcam

Anticuerpo	Proteína/Diana	Especie, Descripción	Uso, Dilución	Referencia	Casa Comercial
Anti-GPD1	Glicerol fosfato deshidrogenasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/150	(Santacatterina et al., 2015)	Lab. J.M. Cuezva
Anti-HADHA	Subunidad α de la enzima trifuncional	Conejo, mAb	RPPma, 1/100	ab54477	Abcam
Anti-IF1	Inhibidor de ATPasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/150	(Santacatterina et al., 2015)	Lab. J.M. Cuezva
anti-JNK	JNK	Conejo, pAb	WB, 1/1000	4672	Cell Signaling
Anti-MFN2	Mitofusina 2	Ratón, mAb	RPPma	Ab56889	Abcam
Anti-MuRF1 (C-11)	Proteína ubiquitina ligasa E3 TRIM63	Ratón, mAb	WB, 1/500	sc-398608	Santa Cruz Biotechnology
Anti-NADH9	Subunidad 9 de la NADH deshidrogenasa	Ratón, mAb	RPPma, 1/1000	(Santacatterina et al., 2015)	Lab. J.M. Cuezva
Anti-NANOG	NANOG	Cabra, mAb	IF, 1/25	AF1997	R&D
Anti-OCT3/4	OCT3/4	Ratón, mAb	IF, 1/60	Sc-5279	Santa Cruz Biotechnology
anti-p38	p38	Ratón, mAb	WB, 1/1000	9228	Cell Signaling
Anti-PRX3	Peroxirredoxina 3 (mitocondrial)	Conejo, mAb	RPPma, 1/250	LF-PA0030	Ab Frontier
Anti-PRX6	Peroxirredoxina 6 (citosólica)	Conejo, mAb	RPPma, 1/250	ab59543	Abcam
Anti-SOD1	Superóxido dismutasa 1 (citosólica)	Conejo, mAb	RPPma, 1/100	sc-11407	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SOD2	Superóxido dismutasa 2 (mitocondrial)	Conejo, mAb	RPPma, 1/100	ab13533	Abcam
Anti-SOX2	SOX2	Conejo, mAb	IF, 1/100	PA1-16968	Thermo Scientific
Anti.SSEA3	SSEA3	Rata, mAb	IF, 1/3	MC-631	Hybridoma Bank
Anti-SSEA4	SSEA4	Ratón, mAb	IF, 1/3	MC-813-70	Hybridoma Bank
Anti-TRA1-60	TRA1-60	Ratón, mAb	IF, 1/200	MAB4360	Merck Millipore
Anti-TRA1-81	TRA1-81	Ratón, mAb	IF, 1/200	MAB4381	Merck Millipore
Anti-Tuj1	Tubulina β III	Ratón, mAb	IF, 1/500	MMS-435P	Convance
Anti-TXN	Tioxirredoxina	Conejo, mAb	RPPma, 1/200	PA02814A0Rb	Cusabio
Anti-UQCRC2	CORE2	Ratón, mAb	RPPma, 1/500	ab14745	Abcam

1.5. Oligonucleótidos

Para los estudios de miRNAs, amplificación de DNA, secuenciación o edición génica se han utilizado distintas variedades de oligonucleótidos que se recogen en las siguientes tablas.

Tabla 2: Oligonucleótidos específicos de la amplificación de miRNAs

miRNA	Nombre	Secuencia 5'-3' *	Uso	Referencia	Casa comercial
miR-1a-3p	hsa-miR-1a-3p	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	qPCR	YP00204344	QIAGEN
miR-22-3p	hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	qPCR	YP00204606	QIAGEN
miR-23a-3p	hsa-miR.23.3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	qPCR	YP00204772	QIAGEN
miR-25-3p	hsa-miR25-3p	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	qPCR	YP00204361	QIAGEN
miR-29a-3p	hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	qPCR	YP00204698	QIAGEN
miR-30c-5p	hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC	qPCR	YP00204783	QIAGEN
miR-103a-3p	hsa-miR-103-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	qPCR	YP00204063	QIAGEN
miR-133a-3p	hsa-miR-133a-3p	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG	qPCR	YP00204788	QIAGEN
miR-199a-5p	hsa-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCGUUC	qPCR	YP00204494	QIAGEN
miR-199b-5p	mmu-miR-199b-5p	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	qPCR	YP00204152	QIAGEN
miR-208a-3p	hsa-miR-208a-3p	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	qPCR	YP00205619	QIAGEN
miR-328-3p	hsa-miR-328-3p	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU	qPCR	YP00204364	QIAGEN
miR-338-3p	hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG	qPCR	YP00204719	QIAGEN
miR-350	rno-miR-350	UUCACAAAGCCCAUACACUUUCAC	qPCR	YP00205719	QIAGEN
miR-378a-3p	mmu-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	qPCR	YP00204179	QIAGEN
miR-423-3p	hsa-miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGCCCCUCAGU	qPCR	YP00204488	QIAGEN
miR-499a-5p	hsa-miR-499a-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU	qPCR	YP00205935	QIAGEN
U6	U6 snRNA		qPCR	YP00203907	QIAGEN

Pie de tabla. Los oligonucleótidos utilizados presentan una secuencia del tipo LNA.

Tabla 3: Oligonucleótidos para estudios de expresión génica

Gen	Nombre	Secuencia 5'-3'	Uso	Casa Comercial
Col1a1	Col1a1 F	TCTACTGCAACATGGAGACAGG	qPCR	Sigma-Aldrich
Col1a1	Col1a1 R	AACCAGACGTGCTTGTTTTCC	qPCR	Sigma-Aldrich
Col1a2	Col1a2 F	TTTAAGAAGCCCCGTAGCCA	qPCR	Sigma-Aldrich
Col1a2	Col1a2 R	AGCCCAGACCTGCCTTATTT	qPCR	Sigma-Aldrich
Col3a1	Col3a1 F	ATTGCTGGAGTTGGAGGTGA	qPCR	Sigma-Aldrich
Col3a1	Col3a1 R	GTTCCGGGTGGCAGAATTTT	qPCR	Sigma-Aldrich
Esrra	Esrra-F	CCTGGTCTGTGGGGATGT	qPCR	Sigma-Aldrich
Esrra	Esrra-R	GGACAGCTGTACTCGATGCTC	qPCR	Sigma-Aldrich
Gapdh	mGapdh - F	AGCTGAACGGGAAGCTCACT	qPCR	Sigma-Aldrich
Gapdh	mGapdh - R	GCTTCACCACCTTCTTGATGTC	qPCR	Sigma-Aldrich
Med13	Med13 F	ATCCATCAAGTGCCTGCTTC	qPCR	Sigma-Aldrich
Med13	Med13 R	GTGCGGACTGAGGATCAACT	qPCR	Sigma-Aldrich
Myh7	Myh7 F	ATCAATGCAACCCTGGAGAC	qPCR	Sigma-Aldrich
Myh7	Myh7 R	CGAACATGTGGTGGTTGAAG	qPCR	Sigma-Aldrich
Nppa	Nppa F	ATGGGCTCCTTCTCCATCAC	qPCR	Sigma-Aldrich
Nppa	Nppa R	TCTACCGGCATCTTCTCCTC	qPCR	Sigma-Aldrich
Nppb	Nppb F	AAGTCTAGCCAGTCTCCAGA	qPCR	Sigma-Aldrich
Nppb	Nppb R	GAGCTGTCTCTGGCCATTTTC	qPCR	Sigma-Aldrich
Nrf1	Nrf1-F	TGGAGTCCAAGATGCTAATGG	qPCR	Sigma-Aldrich
Nrf1	Nrf1-R	GCGAGGCTGGTTACCACA	qPCR	Sigma-Aldrich
PCCB	1091A	GGATGGCTGCTGAGGACAAA	Secuenciación	Sigma-Aldrich
PCCB	1199B	TCCCACCACGGCTATGCTGTAG	Secuenciación	Sigma-Aldrich
PCCB	ins12_del14	CACCATGCCGGATGATGCC	PCR	IDT
PCCB	PCCB LargeA F	TCATGTCTAGGCACAGCACA	ddPCR	IDT
PCCB	PCCB LargeA R	CAGCCCTGGTAAAACCTCTGC	ddPCR	IDT
PCCB	PCCB SmallA F	TCTAGGCACAGCACAGGAAT	ddPCR	IDT
PCCB	PCCB SmallA R	AGGAAAGTGAGCAGGGTCAT	ddPCR	IDT
PCCB	PCCB Sonda FAM	TGGCACCATGCCGGATGATGC	ddPCR	IDT
PCCB	PCCB Sonda HEX	TAGAGCACAGGAATGGTGCCAAG	ddPCR	IDT
Ppara	Ppara-F	CACGCATGTGAAGGCTGTAA	qPCR	Sigma-Aldrich
Ppara	Ppara-R	GCTCCGATCACACTTGTCG	qPCR	Sigma-Aldrich

Gen	Nombre	Secuencia 5'-3'	Uso	Casa Comercial
<i>Ppard</i>	Ppard-F	GTATGCGCATGGGACTCAC	qPCR	Sigma-Aldrich
<i>Ppard</i>	Ppard-R	GTCTGAGCGCAGATGGACT	qPCR	Sigma-Aldrich
<i>Pparg</i>	Pparg-F	CCACCAACTTCGGAATCAGCT	qPCR	Sigma-Aldrich
<i>Pparg</i>	Pparg-R	TTTGTGGATCCGGCAGTTAAGA	qPCR	Sigma-Aldrich
<i>Ppargc1a</i>	Ppargc-1a-F	GAAAGGGCCAAACAGAGAGA	qPCR	Sigma-Aldrich
<i>Ppargc1a</i>	Ppargc-1a-R	GTAAATCACACGGCGCTCTT	qPCR	Sigma-Aldrich
<i>Ppargc1b</i>	Ppargc-1b-F	CTCCAGTTCGGCTCCTC	qPCR	Sigma-Aldrich
<i>Ppargc1b</i>	Ppargc-1b-R	CCCTCTGCTCACGTCTG	qPCR	Sigma-Aldrich
<i>Tfam</i>	Tfam-F	CAAAGGATGATTCGGCTCAG	qPCR	Sigma-Aldrich
<i>Tfam</i>	Tfam-R	AAGCTGAATATATGCCTGCTTTTC	qPCR	Sigma-Aldrich

Tabla 4: Oligonucleótidos para estudios de edición génica y modulación de miRNAs

Nombre	Secuencia 5'-3'	Uso	Casa Comercial
CRISPR crRNA 1	RNA: ACAGGAATACGGTAGAGCAC	Edición génica	IDT
CRISPR crRNA 2	RNA: AATACGGTAGAGCACAGGAA	Edición génica	IDT
CRISPR crRNA 3	RNA: ATACGGTAGAGCACAGTGAA	Edición génica	IDT
antagomiR-208a	LNA: CTTTTGCTCGTCTTA	Tratamiento del modelo murino	QIAGEN
antagomiR-control	LNA: ACGTCTATACGCCCA	Tratamiento del modelo murino	QIAGEN
mimic control	LNA: TCACCGGGTGAAATCAGCTTG	Validación funcional	QIAGEN
mimic miR-338-3p	LNA: UCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUG	Validación funcional	QIAGEN
mimic miR-350	LNA: TTCACAAAGCCCATACACTTTCAC	Validación funcional	QIAGEN

1.6. Reactivos y otros materiales

Toda la información referida a los reactivos utilizados en el desarrollo de este trabajo, así como de las diferentes soluciones y kits empleados se recogen en las siguientes tablas.

Tabla 5: Reactivos

Reactivo/Producto	Referencia	Casa Comercial/Origen	Uso
Ácido ascórbico	A4403-100MG	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
Ácido retinoico	R2625-50MG	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
Acrilamida 2X	10675	Serva	WB
Actin-Green	R-37110	ThermoFisher	Inmunofluorescencia
Acutasa	SCR005	Millipore	Cultivos celulares
Agarose D1 Low EEO	8010	Conda	Análisis productos PCR
Albúmina de suero bovino, libre de ácidos grasos >96%	A6003	Sigma-Aldrich	WB, inmunofluorescencia
Ampicilina	Roche	70232322	Cultivos de bacterias
APS (persulfato amónico)	1201	Merck	WB
Autofluorescence Eliminator Reagent	2160	Millipore	Inmunofluorescencia
B-27™ supplement, serum free	17504044	Thermo Fisher Scientific	Cultivos celulares
Bezafibrato	B7273	Sigma	Tratamiento del modelo murino
Biorad Protein Assay (Bradford)	500-006	Biorad	WB
Bisacrilamida 2X	1108970050	Merck	WB
CloneR 10X	05888	Stem Cell Technology	Cultivos celulares
Cloroformo	1.02445.1000	Merck	Extracción de RNA
Colcemid	9311	IrvineScientific	Cultivos celulares
Complete miniEDTA free	11836170001	Roche	WB
CRISPR tracrRNA	1073189	IDT	Edición génica
CryoStor CS10	07930	Stem Cell Technology	Cultivos celulares
DAPI	168298	Merck	Marcaje DNA
Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H ₂ DCFDA)	D399	Invitrogen	Citometría de flujo
Dimetil sulfoxido (DMSO)	D2650-100ml	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco)		CBMSO	Cultivos celulares
DNA Molecular Weight Marker ϕ 29		CBMSO	Análisis productos PCR
dNTP Mix 10 mM	18427-088	Invitrogen	PCR
Donkey serum	S30	Chemicon	Inmunofluorescencia
DTT (Ditiotreitol)	37291	Sigma-Aldrich	WB
ECL Western Blotting Detection	RPN 2106	GE Healthcare	WB
EDTA (Ácido etilendiaminotetracético)		CBMSO	Cultivos celulares

Reactivo/Producto	Referencia	Casa Comercial/Origen	Uso
EmbryoMax® 0.1% Gelatin Solution	ES-006-B	Millipore	Cultivos celulares
Enzima de restricción MspI	R0106S	New England Biolabs	Edición génica
Etanol	100983	Merck	Extracción de RNA
FBS (Suero Fetal Bovino)	10270_106	Gibco	Cultivos celulares
Fibronectina	F11-41	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
Formalina 10%	HT501128-4L	Sigma-Aldrich	Inmunofluorescencia
Gibco™ DMEM/F-12, GlutaMAX™ Supplement	31331093	Thermo Fisher Scientific	Cultivos celulares
Glutamina	25030-81	Gibco BRL	Cultivos celulares
Human Albumin Grifols® 20% (HSA)	3045361	Grifols	Inmunofluorescencia
iBlot™ 2 Transfer Stacks, nitrocellulose, mini	IB23002	Invitrogen	WB
iBlot™ Transfer Stack, nitrocellulose, regular size	IB301001	Invitrogen	WB
Imalgene 100 mg/ml (Ketamina)		Merial	Anestesia
Insulina bovina de páncreas	I6634-50MG	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
Ioduro de propidio	P4170	Sigma-Aldrich	Citometría de flujo
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG)	I5502-1G	Sigma-Aldrich	Cultivos de bacterias
KnockOut™ Serum Replacement	10829018	Gibco	Cultivos celulares
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	11668027	Fisher Scientific	Transfección
Matrigel® hESC-Qualified Matrix	354277	Corning	Cultivos celulares
Medio Claycomb	51800C	Merck	Cultivos celulares
MEM (Medio Esencial Mínimo)		CBMSO	Cultivos celulares
2-Mercaptoetanol	M3148	Sigma-Aldrich	Extracción de RNA
Mezcla de antibióticos		CBMSO	Cultivos celulares
mTSER plus	05825	Stem Cell Technology	Cultivos celulares
mTSER1	85850	Stem Cell Technology	Cultivos celulares
N-2 supplement 100x	17502048	Thermo Fisher Scientific	Cultivos celulares
Nitrocellulose blotting membrane 0,2 μm	10600001	GE Healthcare	WB
Norepinefrina	A0937-1G	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
Novex™ Sharp Pre-stained Protein Standard	LC5800	ThermoFisher	WB
Nucleasa Cas9	1081058	IDT	Edición génica
NuPAGE LDS 4X sample buffer	NP0008	Invitrogen	WB
4-12% NuPage Precast Gels	NP0323	Invitrogen	WB
NZYDNA Ladder 5	MB06101	NZYTECH	Análisis productos PCR
OptiMEM I Reduced Serum Medium (1X) Liquid	31985062	Fisher Scientific	Transfección

Reactivo/Producto	Referencia	Casa Comercial/Origen	Uso
Peróxido de hidrógeno	H1009	Sigma-Aldrich	Citometría de flujo
PhostopPhosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	4906837001	Roche	WB
Ponceau	32819	USB	WB
Prolong gold antifade	36930	Invitrogen	Medio de montaje
Propionato sódico	P-1880	Sigma	Ensayo toxicidad
ProSieve Protein Marker	50550	Lonza	WB
ReLeSR	05872	Stem Cell Technology	Cultivos celulares
Rompun (Hidrocloruro de xilacina)		Bayer	Anestesia
SDS (Dodecil Sulfato Sódico) 10%		CBMSO	WB
Solución de Gelatina 0,1%	ES-B-006	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
Suero fisiológico vitulia (0,9%)		Laboratorios ERN	Perfusión
SuperSignal West FEMTO Maximum Sensitivity Substrate	34096	Fisher Scientific	WB
TEMED (Tetrametiletilendiamida)	161-0801	Biorad	WB
Tripsina		CBMSO	Cultivos celulares
Tritón X-100	11332481001	Roche	Inmunofluorescencia
Trypan Blue 0,4%	T8154	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
Tween 20 Reagent	655205	VWR	WB
X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-Galactósido)	BIMB1001	Apollo	Cultivos de bacterias
XL1-Blue Supercompetent Cells		Servicio de fermentación CBMSO	Cultivos de bacterias
Y-27632	72304	Stem Cell Technology	Cultivos celulares

Tabla 6: Soluciones y tampones

Solución	Composición	Uso
Medio Ectodermo	Neurobasal™ medium 50%, Gibco™ DMEM/F-12 50%, GlutaMAX™ 2 mM, B-27™ 1x, N-2 1X, antibióticos	Diferenciación de iPSC
Medio Endodermo	DMEM, FBS 20%, Glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 100 μ M, antibióticos	Diferenciación de iPSC
Medio Mesodermo	Gibco™ DMEM/F-12, FBS 20%, Glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 100 μ M, antibióticos, ácido ascórbico 100 μ M	Diferenciación de iPSC
NuPAGE MES SDS Running buffer	MES 50 mM, Tris base 50 mM, SDS 0,1%, EDTA 1 mM, pH7,3	WB
PBS	NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na ₂ HPO ₄ 8 mM, KH ₂ PO ₄ 1,5 mM	WB
Solución de bloqueo A	PBS/TBS 1X, Tween 20 0,1%, leche/BSA 5%	WB
Solución de bloqueo B	PBS 1X, Triton X100, 0,1%, BSA 5%	Microscopía confocal
Solución de bloqueo C	TBS 1X, Tritón 0,3% y Donkey Serum 3%	Microscopía confocal
Solución de deshibridación	PBS 1X, Tween 20 0,05%, Glicina 0,2 M	WB

Solución	Composición	Uso
Solución de lavado	PBS/TBS 1X, Tween 20 0,1%	WB
Solución de permeabilización	PBS 1X, Triton X100 0,1%	Microscopía confocal
Tampón de lisis (células)	Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X100 0,1%, Glicerol 10%	WB
Tampón de lisis (tejidos)	Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, Triton X100 1%, SDS 0,1%, EDTA 0,4 mM	WB
Tampón electroforesis	Tris-Glicina 10X, SDS 20%	WB
Tampón TAE	Tris-Acetato 40 mM, EDTA 2 mM	Electroforesis de DNA
TBS	Tris-HCl 50 mM, NaCl 276 mM, KCl 54 mM pH 8	WB

Tabla 7: Kits

Kit	Referencia	Casa Comercial	Uso
Amaxa™ Human Stem Cell Nucleofector™ Kit 2	VPH-5022	Lonza	Nucleofección
AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit	4322288	Applied Biosystems	Análisis microsatélites
Cycle Pure Kit	D6492-02	Omega	Purificación de productos de PCR
ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP)	1863024	Biorad	ddPCR
Fast Start Taq DNA polymerase 1000U	12032937001	Roche	PCR
miRCURY LNA RT Kit	339340	QIAGEN	Retro-transcripción
miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit	339346	QIAGEN	qPCR
miRNeasy Mini kit	217004	QIAGEN	Extracción RNA y miRNAs
miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit	217184	QIAGEN	Extracción miRNAs
NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit	MB12502	NZYTEch	Retro-transcripción
NZY Miniprep	A1330	Promega	Aislamiento de DNA plasmídico- Miniprep
Perfecta SYBR Green Fast Mix	95072	Quanta Biosciences	qPCR
pGEM®-T Easy Vector System I	A1360	Promega	Clonación de productos de PCR
QIAamp DNA Mini Kit	51304	QIAGEN	Extracción de gDNA
ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System	A2051	Promega	Extracción de gDNA
Supreme NZYTaq II 2x Green Master Mix	MB36002	NZYTEch	PCR

1.7. Herramientas informáticas

Tabla 8: Programas informáticos

Nombre	Aplicación	URL
BLAST	Alineamiento de secuencias	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Breaking Cas	Diseño de guías de RNA para el sistema CRISPR-Cas9	https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/
Chromas	Análisis de secuencias nucleotídicas	http://technelysium.com.au
FIJI	Procesamiento y análisis de imágenes de microscopía	http://fiji.sc/Fiji
ImageLab	Cuantificación de bandas de WB	Servicio de Informática del CBMSO
Panther GO	Estudios de proteómica	http://www.pantherdb.org/
Primer 3	Diseño de oligonucleótidos	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
Pymol	Modelado de estructuras proteicas	http://pymol.org
QuantaSoft	Análisis de resultados ddPCR	Biorad
Quantity One	Cuantificación de bandas de WB	Servicio de Informática del CBMSO
SnapGene	Análisis de secuencias nucleotídicas	https://www.snapgene.com/
SPSS	Análisis estadístico	Servicio de Informática del CBMSO

Tabla 9: Bases de datos

Nombre	Aplicación	URL
Ensembl	Genomas	http://ensembl.org
GeneCards	Base de datos integrativa	http://genecards.org
Human miRNA Tissue Atlas	Expresión tisular de miRNAs	http://ccb-web.cs.unisaarland.de/tissueatlas/
miRBase	Predicción de dianas de miRNAs	http://www.mirbase.org
MiRTarBase	Dianas de miRNAs validadas de forma experimental	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php
miRWalk 2.0	Implicación de miRNAs en vías de señalización y enfermedades humanas	http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/
NCBI	Genomas	http://ncbi.nih.gov
TargetScan	Predicción de dianas de miRNAs	http://www.targetscan.org/vert_71/
UCSC (University of California, Santa Cruz)	Genomas	http://genome.ucsc.edu
Uniprot	Proteínas	http://uniprot.org

2. MÉTODOS

2.1. Cultivos celulares

2.1.1. Mantenimiento de los cultivos

La línea celular de hepatoma humano Hep3B se cultivó con MEM (Minimal Essential Medium) suplementado con glutamina 2 mM, suero fetal bovino (FBS) al 5% y una mezcla de antibióticos. El cultivo de los cardiomiocitos de origen murino HL-1 se realizó con el medio Claycomb suplementado con glutamina 2mM, FBS al 10% y antibióticos, además de con ácido ascórbico 0,3 M, ácido retinoico 1 mM, insulina a 5 mg/ml y norepinefrina 0,1 M (excepto para ensayos de toxicidad del propionato donde no se añade norepinefrina). Pevio al cultivo de los HL-1, la placa se trata durante 24 horas con una mezcla de gelatina 0,1% (*EmbryoMax® 0.1% Gelatin Solution*) y fibronectina 12,5 mM. Para la recogida de estas líneas celulares, en ambos casos se trató con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,2%, para a continuación sedimentar las células por centrifugación. Su conservación en N₂ líquido se lleva a cabo en una solución de suero fetal bovino con 5% de DMSO.

Con respecto al cultivo de las iPSC, las placas se tratan previamente con matrigel a 8-12 µg/ml. Las iPSC se cultivan en medio mTSEr plus sin suplementos de glutamina, FBS o antibióticos. Para la recogida de estas células, se trataron con ReleasR durante 1 minuto para incubarlas a continuación a 37°C durante 5-10 minutos y se centrifugaron para sedimentar las células. Su conservación en N₂ líquido se lleva a cabo en una solución de medio mTSEr plus suplementado con *KnockOut™ Serum Replacement* (Gibco) y DMSO 10%.

Todas las líneas celulares han sido mantenidas en condiciones de cultivo estándar, con un 95% de humedad relativa, 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C.

2.1.2. Transfecciones

Para el análisis funcional de los miRNAs miR-350 y miR-338-3p, las células HL-1 y Hep3B se plaquearon 24 horas antes de la transfección, respectivamente, a una densidad de $2,4 \cdot 10^5$ células por pocillo en placas de 6 pocillos. Las transfecciones del miR-350 mimic (20 nM) y del miR-338-3p mimic (25 nM) se llevaron a cabo usando la lipofectamina 2000 y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se recogieron 96 horas después para posteriores análisis de RNA y proteína.

2.1.3. Tratamiento con propionato sódico

Para el tratamiento de la línea HL-1, las células se sembraron tres días antes de iniciar el tratamiento en placas de 6 pocillos a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células por pocillo. Posteriormente, las células se cultivaron en medio Claycomb suplementado con 5 mM de propionato sódico (Sigma Aldrich), renovando el medio suplementado cada 48 horas. Las células se recogieron tras cuatro

días de tratamiento para el análisis de marcadores de daño cardiaco, mientras que para el estudio de miRNAs las células se mantuvieron durante ocho días en cultivo.

2.1.4. Caracterización de la línea isogénica de iPSC derivada de un paciente PCCB

2.1.4.1. Diferenciación *in vitro* a las 3 capas germinales

Para analizar la capacidad de diferenciación de las iPSC a las 3 capas germinales, en primer lugar, las células se cultivaron en suspensión para permitir la formación de agregados denominados cuerpos embrionarios. Para ello, las células se disgregaron e individualizaron mediante su tratamiento con acutasa y se resuspendieron en un volumen total de 12 mL de medio mTSErplus. A continuación, se sembraron las células en una placa de baja adherencia de 96 pocillos con fondo en forma de V, y se centrifugó la placa a 900 g durante 10 minutos para favorecer la agregación de las células y formación de los cuerpos embrionarios. Tras dos días en cultivo, los cuerpos embrionarios ya formados fueron transferidos a una placa P60 donde se mantuvieron en presencia de medio mTSErplus fresco durante 48 horas más. Posteriormente, los cuerpos embrionarios se transfirieron a placas Ibidi® de 8 pocillos, previamente tratadas con matrigel, y se cultivaron en presencia de los medios de diferenciación correspondientes a cada una de las capas germinales (**Tabla 6**) durante 18 días renovando el medio cada 48 horas.

2.1.4.2. Estudio del cariotipo

Las células se trataron con el reactivo colcemid (InvitroScience), agente que impide la formación del huso mitótico de tal manera que se bloquea la división celular, a una concentración de 10 µg/mL. Posteriormente, las células se disgregaron e individualizaron mediante su tratamiento con acutasa y se llevaron al Servicio de Citogenética de Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en Madrid donde se realizó el estudio.

2.1.4.3. Análisis de microsatélites

El estudio de la integridad genética de la línea isogénica generada se llevó a cabo usando el kit de amplificación por PCR AmpFLSTR® Identifiler® (Thermo Fisher Scientific). Para ello, se utilizó 1 ng de gDNA y se analizaron las regiones altamente polimórficas que contienen secuencias cortas repetidas en tándem mediante la amplificación de los siguientes marcadores por PCR: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1P0, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA y Amelogenina. Las muestras se evaluaron en un analizador de DNA 3730 (Applied Biosystems) y el análisis se realizó usando el software *GeneMapper® v4.0* en el Parque Científico de Madrid, Campus Moncloa, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid.

2.2. Citometría de flujo

Los niveles intracelulares de ROS se analizaron mediante citometría de flujo empleando para ello la sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato o H₂DCFDA (Invitrogen), consistente en una forma de fluoresceína reducida químicamente. Esta molécula sufre un proceso de oxidación en presencia de ROS dando lugar a la forma oxidada de la sonda o DCF, capaz de emitir fluorescencia a una longitud de onda comprendida entre 517-527 nm. Para el análisis de los niveles intracelulares de ROS, la línea HL-1 se sembró a una densidad de 40.000 células por pocillo, para a continuación seguir con el tratamiento tal y como se indica en el apartado 2.1.3. Una vez terminado el tratamiento, las células se levantaron con tripsina y se resuspendieron en una solución de PBS 1X con la sonda H₂DCFDA a una concentración de 5 µM. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, las células se sometieron a un proceso de centrifugación para promover su sedimentación durante 5 minutos a 220 g. Posteriormente, las células se resuspendieron nuevamente en PBS 1X, añadiendo 1 µL de ioduro de propidio (IP) al 0,05% como control de muerte celular justo antes del análisis de las muestras por el citómetro. La medición de la fluorescencia emitida se llevó a cabo usando el citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson Biosciences) y su posterior análisis se realizó mediante el programa FlowJo.

En el análisis de pluripotencia de la línea de iPSC generada como control isogénico, las células se trataron con acutasa para individualizarlas, resuspendiéndolas en una solución de PBS 1X al 2% de albúmina humana (HSA) a una densidad de 200.000 células por cada 100 µL. A continuación, las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C con un anticuerpo primario específico (TRA1-60, TRA1-81 o SSEA4, [Tabla 1](#)). Posteriormente, las células se sometieron a dos procesos de lavado con PBS-HSA 2% y se incubaron 20 minutos a 4°C con los anticuerpos secundarios anti-ratón IgG Alexa Fluor® 647 o anti-ratón IgM Alexa Fluor® 647 según correspondiera. Finalmente, el análisis de las células se llevó a cabo en el citómetro FACSCanto A (Becton Dickinson) utilizando el programa FlowJo 10.2. Los controles negativos de células iPSC sin teñir o tratadas únicamente con los anticuerpos secundarios fueron utilizados para normalizar los resultados a través de la exclusión de la fluorescencia no específica.

2.3. Microscopía confocal

En el estudio de toxicidad del propionato, las células HL-1 se cultivaron en presencia de propionato a 5 mM durante 6 días, renovando el medio cada 48 horas. A continuación, las células se sembraron sobre cristales de 0,2 micras en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo, renovando el medio cada 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se sometieron a un proceso de fijación mediante su incubación con una solución de

formalina al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de fijación, las células se lavaron 3 veces consecutivas con PBS 1X y se trataron a continuación 2 minutos y en frío con la solución de permeabilización (**Tabla 6**) con el objetivo de facilitar la entrada de las sondas de marcaje posterior. Se lava entonces la solución de permeabilización y se llevó a cabo la incubación de las células con la solución de bloqueo B (**Tabla 6**) durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se trataron con el marcador de actina filamentosa Actin-Green (ThermoFisher) a dilución 1/25 o 1/50 en PBS 1X durante 1h, lavando las muestras con PBS-tween 0,05% una vez terminada la incubación. Para el marcaje del núcleo celular, se llevó a cabo una incubación durante 10 minutos con el reactivo DAPI a una dilución 1/5.000 en solución de bloqueo, a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, se lavaron las muestras de forma secuencial en H₂O mQ y etanol al 70%, y se procedió al montaje de las muestras mediante su adhesión a un portaobjetos utilizando el reactivo *prolong gold antifade* (Invitrogen). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss) con software ZEN 2010. Se tomaron un total de diez fotos por cada condición utilizando un objetivo 63x, y su análisis se realizó utilizando el programa Fiji (N.I.H., USA).

Para la caracterización de la expresión de marcadores de pluripotencia en la línea de iPSC isogénica generada sobre el fondo de un paciente PCCB, las células se cultivaron sobre una placa Ibidi® previamente tratada con matrigel durante 3 días. Posteriormente, las células se fijaron a la placa mediante su incubación con una solución de formalina al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de fijación, las células se lavaron 3 veces consecutivas con una solución de TBS 1X. A continuación, las células se trataron con la solución de bloqueo C (**Tabla 6**) y se incubaron con los anticuerpos primarios NANOG, OCT3/4, SOX2, SSEA3, SSEA4, Tra1-60 y Tra1-81 (**Tabla 1**) diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se sometieron a 3 lavados consecutivos con TBS 1X y se incubaron 2 horas a 37°C con los anticuerpos secundarios anti-cabra IgG Alexa Fluor® 647, anti-conejo IgG Alexa Fluor® 488, anti-rata IgM Alexa Fluor® 488, anti-ratón IgG Alexa Fluor® 555, anti-ratón IgM Alexa Fluor® 555 o anti-ratón IgM Alexa Fluor® 647 según correspondiera. Tras 30 minutos a temperatura ambiente, las células se lavaron con TBS 1X y se incubaron 10 minutos con el reactivo DAPI a una dilución 1/10.000 en solución de bloqueo. Finalmente, las imágenes fueron tomadas con un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss) con software ZEN 2010. Se tomaron un total de siete fotos por cada condición utilizando un objetivo 20x, y su análisis se realizó utilizando el programa Fiji (N.I.H., USA).

Por último, para determinar la capacidad de diferenciación *in vitro* de las iPSC, se analizaron los marcadores propios de cada una de las capas germinales mediante inmunofluorescencia. Para ello, los cuerpos embrionarios se fijaron a la placa mediante su incubación con una solución de formalina (Sigma-Aldrich) al 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de fijación, las células se lavaron 3 veces consecutivas con una solución de TBS 1X. A continuación, las células se trataron con la solución de bloqueo C (Tabla 6). Posteriormente, los cuerpos embrionarios se incubaron a 4°C toda la noche con anticuerpos primarios específicos para cada una de las capas germinales: α -1-fetoproteína (endodermo), α -actina de músculo liso (mesodermo) y β -III-tubulina Tuj1 (ectodermo) (Tabla 1). Al día siguiente, los cuerpos embrionarios se sometieron a tres lavados consecutivos con TBS 1X y se incubaron 2 horas a 37°C con los anticuerpos secundarios anti-conejo IgG Alexa Fluor® 488 o anti-ratón IgG Alexa Fluor® 555 según correspondiera. Finalmente, las muestras se trataron durante 10 minutos con el reactivo DAPI diluido en solución de bloqueo a concentración 1/10.000. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss) con software ZEN 2010. Se tomaron un total de siete fotos por cada condición utilizando un objetivo 40x, y su análisis se realizó utilizando el programa Fiji (N.I.H., USA).

2.4. Técnicas de ácidos nucleicos

2.4.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

El aislamiento de los ácidos nucleicos de las diferentes muestras empleadas en la realización de este trabajo se llevó a cabo siguiendo los protocolos y las recomendaciones indicadas por los proveedores de los distintos kits de extracción de ácidos nucleicos utilizados. En cuanto a la extracción de ácidos nucleicos de muestras de tejido, los animales se sacrificaron por inhalación de CO₂, y a continuación corazón y cerebro se extrajeron y cortaron en partes más pequeñas para inmediatamente congelarlas en nitrógeno líquido para su posterior homogenización con dos tipos de herramientas: *Qiagen TissueLyser II* o *IKA ultraturrax*. Para el aislamiento de los ácidos nucleicos en las líneas de células transformadas, se empleó el tratamiento con tripsina para levantarlas de la placa de cultivo, a continuación, se resuspendieron en PBS 1X y se centrifugaron a 16.000 g, obteniendo de esta manera un precipitado celular. En el caso de las iPSC, éstas se trataron con ReleasR o acutasa para a continuación resuspenderlas en PBS 1X o tampón de lisis e iniciar el proceso de extracción de ácidos nucleicos.

Los distintos métodos empleados para el aislamiento de ácidos nucleicos a lo largo del trabajo realizado se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 10: Métodos de extracción de ácidos nucleicos

Muestra de partida	Tipo de ácido nucleico	Metodo de Aislamiento	Uso
Células iPS	gDNA	QIAamp DNA Mini Kit	Secuenciación
Células iPS	gDNA	ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System	ddPCR
Células transformadas	RNA	miRNeasy Mini Kit	qRT-PCR
Cultivos bacterianos	DNA plasmídico	NZYMiniprep	Secuenciación
Plasma de pacientes de AP	miRNAs	miRNeasy Serum/Plasma Advanced kit	qRT-PCR
Tejido de ratón	RNA	miRNeasy Mini Kit	qRT-PCR

2.4.2. Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos

La cuantificación y pureza de los ácidos nucleicos se analizó mediante su medición en el *Nanodrop One* (ThermoScientific), teniendo en consideración los valores obtenidos de las relaciones A260/230 y A260/280. El posterior análisis de gDNA y DNA plasmídico se llevó a cabo en cubetas de desarrollo horizontal acopladas a una fuente de energía con tampón de electroforesis TAE (Tabla 6). Tras la electroforesis, el patrón de bandas obtenido se analizó con un transiluminador acoplado a una cámara, permitiendo comparar sobre la imagen las bandas obtenidas en referencia a distintos marcadores de tamaño conocido: *DNA Molecular Weight Marker V* (NZYtech) y *phi29* (CBMSO).

2.4.3. RT-PCR cuantitativa

Para el estudio de expresión de miRNAs en células, tejidos y plasma, el cDNA se obtuvo por la retrotranscripción del RNA obtenido de todas estas muestras utilizando el kit *miRCURY LNA RT Kit* (QIAGEN). Una vez obtenido el cDNA, la reacción de PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando el kit *miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit* (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del proveedor y utilizando una serie de oligonucleótidos específicos (Tabla 2), en un equipo *LightCycler 480* (Roche). La normalización de los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante la utilización de los controles endógenos miR-423-3p y la snRNP U6 en el caso de células y tejidos, y del miR-103a-3p en el caso de las muestras plasmáticas.

En el resto de los estudios de expresión génica por qRT-PCR, el cDNA se obtiene por la retrotranscripción de muestras de RNA total obtenidas tanto de células como de tejidos, utilizando para ello el kit *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (NZYtech). Posteriormente y mediante el uso de oligonucleótidos específicos para estos genes (Tabla 3) se llevó a cabo la qPCR mediante el empleo del kit *Perfecta SYBR Green Mix* (Quanta Biosciences), siguiendo las indicaciones del proveedor, en

un equipo *LightCycler 480* (Roche). La normalización de los resultados se realizó usando el gen *Gapdh* como control endógeno.

En ambos tipos de qRT-PCR los resultados se muestran como la expresión relativa normalizada, que nos permite comparar la expresión diferencial de los distintos tipos de RNA en las distintas muestras, utilizando para ello el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.4.4. Panel de expresión de PI3K-AKT

Una vez obtenido el cDNA procedente de la retrotranscripción como se indica en el apartado anterior, las muestras se agruparon en 4 grupos (*pools*) pertenecientes al grupo control y 4 grupos procedentes de los ratones AP. El perfil de expresión de la vía de señalización PI3K-AKT se realizó con el kit *Mouse phosphatidylinositol 3 kinase-protein kinase B Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array* (QIAGEN), consistente en un panel que contiene oligonucleótidos específicos para 84 genes que forman parte de dicha vía de señalización. La amplificación por PCR a tiempo real fue realizada mediante el kit *Perfecta SYBR Green Mix* (Quanta Biosciences), de acuerdo a las indicaciones del proveedor, en un equipo *ABI 7900HT* (Applied Biosystems), en la unidad de genómica del Parque Científico de Madrid (Madrid, España). El análisis de los resultados obtenidos se realizó empleando el software ABI, que permitió determinar el valor umbral para cada uno de los distintos mRNAs. Los resultados se muestran como la expresión relativa normalizada, usando para ello cinco genes endógenos de expresión constitutiva: *Gapdh*, *B2m*, *Actb*, *Ywhah* y *Gusb*. Los valores para la expresión diferencial de los distintos genes analizados se obtuvieron aplicando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.4.5. Edición génica mediante CRISPR-Cas9

Como paso inicial en el proceso de edición génica, se llevó a cabo un análisis bioinformático mediante la herramienta *Breaking-Cas* para el diseño de las potenciales guías. Para este ensayo, se utiliza la variedad de Cas9 de *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) que reconoce la secuencia PAM “NGG”. En esta herramienta se introduce una secuencia de aproximadamente 300 nucleótidos correspondiente a la región mutante en el gen *PCCB*, y el programa devuelve todas las dianas potenciales a las cuales podemos dirigir el sistema CRISPR-Cas9. La selección de estas guías se llevó a cabo en base a tres criterios: localización, eficiencia de edición o *score* y porcentaje de *off-targets*.

Para la generación del control isogénico de la línea de iPSC del paciente *PCCB*, con una mutación homocigota en el gen *PCCB*, las células se trataron durante las 24 horas previas a la nucleofección con medio mTSER1 suplementado con CloneR 1X. Posteriormente, se individualizaron mediante su tratamiento con acutasa, y de acuerdo con las instrucciones del proveedor se nucleofectaron utilizando el *Amaxa Nucleofector™ II Device* con diferentes ribonucleoproteínas (RNP), formadas por la combinación de 11,5 µg de la proteína Cas9 y 3 µg del

dúplex de RNA constituido por crRNA1, crRNA2 o crRNA3 (Tabla 4), a los que se añaden 75 pmoles del molde de DNA (ssDNA) (Tabla 4). Las células se mantuvieron en cultivo durante 72 horas más y después se trataron nuevamente con acutasa para su crecimiento como colonias individuales aisladas, sembrándolas en placas de cultivo tratadas previamente con matrigel. Las colonias aisladas se mantuvieron en cultivo durante 7-10 días y después se recogieron para su posterior análisis.

2.4.6. Amplificación y análisis de DNA

La amplificación por PCR a partir de gDNA obtenido de las iPSC se llevó a cabo partiendo de una cantidad total de gDNA de entre 200-500 ng, con los oligonucleótidos incluidos en la Tabla 3 siguiendo las indicaciones de los proveedores utilizados, usando el kit *Supreme NZYTaQ II 2x Green Master Mix* en un primer análisis, confirmado después mediante la amplificación utilizando la polimerasa *FastStart Taq DNA polymerase* (Roche). A continuación, se procedió al análisis del patrón de bandas obtenido de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio al 4% (v/v).

Tras la reacción de PCR, el producto obtenido se sometió a la digestión con la enzima de restricción *MspI* y el tampón de reacción *CutSmart* (*English Biolabs*), incubando la muestra en presencia de la enzima durante 1 hora a 37°C, inactivando después la reacción con un periodo de incubación de 15 minutos a 65°C. Finalmente, el producto obtenido de la digestión con la enzima *MspI* se analizó de nuevo en un gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio al 4% (v/v).

2.4.7. PCR digital (ddPCR)

Para el análisis preliminar de edición génica, las muestras de DNA genómico procedentes de iPSC se aislaron utilizando el kit *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System* (Promega), siguiendo las indicaciones y recomendaciones del proveedor. Una vez extraído el DNA, se determinó su concentración y pureza mediante su medición en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

A continuación, el gDNA se diluyó a una concentración de 15 ng/μL para llevar a cabo la reacción de PCR digital o *digital droplet PCR* (ddPCR), utilizando el kit *ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP)* (Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del proveedor, junto con oligonucleótidos específicos (Tabla 3). Para poder distinguir los alelos, se diseñaron sondas específicas (Tabla 3) dirigidas contra la secuencia WT o la secuencia mutante, siendo las sondas *FAM* y *HEX* respectivamente, capaces de emitir fluorescencia a distinta longitud de onda, permitiendo así su correcta identificación. Posteriormente, la mezcla de reacción generada se sometió a un proceso de fraccionamiento en gotas, utilizando el *Automated Droplet Generator* (Biorad), capaz de dividir la muestra de reacción en aproximadamente 20.000 nanogotas uniformes que contendrían una

única molécula de DNA distribuida aleatoriamente. A continuación, la placa se selló utilizando el *PX1™ Plate Sealer* (Biorad), y la reacción de PCR se llevó a cabo en los termocicladores T100™ de Biorad, siguiendo las indicaciones del proveedor. Una vez concluida la reacción de PCR, las muestras se analizaron usando el *QX200 Droplet Reader* y el software *QuantaSoft* (Biorad).

2.4.8. Clonación de productos de PCR

Tras el proceso de edición, los exones 11 y 12 del gen *PCCB* y sus regiones intrónicas flanqueantes se sometieron a un proceso de PCR con oligonucleótidos específicos (**Tabla 3**) para su posterior purificación y clonación en el vector *pGEM®-T Easy Vector System I* (**Tabla 7**), de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. A continuación se transformaron bacterias competentes *E.coli XL1 Blue* (Servicio de Fermentación del CBMSO) y se sembraron en placas de LB con ampicilina a 100 µg/ml, IPTG a 400 µM y X-Gal 0,005%. Se seleccionaron los clones positivos y se crecieron durante 24h en suspensión en medio LB con ampicilina a 100 µg/ml. Finalmente se llevó a cabo el aislamiento de ácidos nucleicos de las bacterias transformadas. Este proceso se realizó con todas aquellas colonias que en un primer ensayo de secuenciación habían mostrado ser heterocigotas, y permite separar los dos alelos pudiendo hacer una lectura de secuencias de mayor calidad.

2.4.9. Purificación y secuenciación de productos de PCR

Una vez obtenido los productos de PCR, se sometieron a un proceso de purificación por columnas empleando para ello el *Cycle Pure Kit*. Posteriormente, los productos de PCR purificados se secuenciaron mediante el método enzimático de terminación de cadena de DNA por incorporación de dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTPs) (Sanger, Nicklen & Coulson, 1977), con la compañía Macrogen. Para realizar dicho proceso de secuenciación se partió de una cantidad inicial de 500 ng de DNA purificado, en conjunto con los oligonucleótidos adecuados para la secuenciación (**Tabla 3**). El análisis de las secuencias se hizo con el programa *Chromas*.

2.5. Técnicas de proteínas

2.5.1. Extracción de proteínas de células y tejidos

Para la extracción proteica de muestras celulares, éstas se trataron con tripsina y después se resuspendieron en PBS 1X. A continuación, se centrifugaron a 16.000 g durante 5 minutos para obtener un precipitado celular. Posteriormente dicho precipitado celular se resuspendió en tampón de lisis (**Tabla 6**) junto con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las muestras fueron sometidas entonces a 3 ciclos sucesivos de congelación directa en N₂ líquido y descongelación a 37°C para favorecer la ruptura de las células. Finalmente, los lisados celulares se centrifugaron a 16.000 g a

una temperatura de 4°C durante 10 minutos, almacenando la fracción del sobrenadante a -80°C hasta su posterior uso.

En el caso de las muestras de tejido, los ratones se sacrificaron en una cámara de CO₂, extrayendo las muestras de corazón y cerebro que se congelaron de forma inmediata en N₂ líquido y almacenaron a -80°C. Aproximadamente 50 mg de tejido se homogeneizaron con un volumen de tampón de lisis (**Tabla 6**) de entre 200-500 µL, complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Para la rotura del tejido se utilizaron dos tipos diferentes de homogeneizadores, el *Qiagen TissueLyser II*, sometiendo las muestras a dos ciclos de agitación de 90 segundos cada uno a una frecuencia de 20 Hz, o el *IKA Ultraturrax*, en este caso con 10 pases de homogenización de 10 segundos cada uno, manteniendo la muestra en hielo. Finalmente, los lisados se centrifugaron a 16.000 g a una temperatura de 4°C durante 30 minutos, almacenando la fracción del sobrenadante a -80°C hasta su posterior uso.

2.5.2. Separación de proteínas en geles SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección

La determinación de la cantidad de proteína se llevó a cabo mediante la cuantificación por el método de Bradford. Una vez conocida la concentración proteica, por muestra se prepararon 50-75 µg de proteína junto con 1 µL de DTT 1 mM, agua y el volumen correspondiente del tampón de carga *NuPAGE LDS Sample Buffer 4X*. Finalmente, las muestras se hirvieron a 95°C durante 4 minutos para desnaturalizar por completo las proteínas.

Para la separación de las proteínas en el proceso de electroforesis se utilizaron, en función del tamaño de la proteína a analizar, geles *Precast* al 10-12% de Biorad empleando el tampón de electroforesis (**Tabla 6**). Los pesos moleculares de las proteínas fueron estimados empleando dos tipos de marcadores de peso molecular: *ProSieve™ Color Protein Markers* (Lonza) y *Novex Sharp Pre-Stained protein Standard* (Invitrogen). La electroforesis se realizó manteniendo un voltaje constante de 120 V durante el tiempo necesario para la correcta separación de las bandas según su peso molecular.

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo *iBlot Dry Blotting System* (Invitrogen) durante siete minutos a 20 V. Para comprobar la eficiencia de la transferencia, las membranas se sometieron a un proceso de tinción con el reactivo rojo Ponceau. A continuación, las membranas se bloquearon durante 1h con leche al 5% disuelta en TBS-Tween 0,1% para el caso de las proteínas totales, y en BSA 5% disuelta en TBS-Tween 0,1% para las proteínas fosforiladas (solución de bloqueo A, **Tabla 6**). Una vez terminado el proceso de bloqueo, las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo primario diluido a la concentración óptima (**Tabla 1**) en su correspondiente solución de bloqueo. La

incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo en agitación y a 4°C durante toda la noche. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se sometieron a 3 procesos consecutivos de lavado con TBS-Tween 0,1% de 10 minutos cada uno. Posteriormente, las membranas se incubaron en presencia del correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP), diluido en solución de bloqueo, durante 1h en agitación. Una vez terminada esta incubación, las membranas de nuevo se lavaron tres veces consecutivas con TBS-Tween 0,1% durante 10 minutos. Finalmente, la detección de proteínas por quimioluminiscencia se realizó utilizando los reactivos ECL o FEMTO, según correspondiera a cada proteína, y mediante el empleo de películas de rayos X RP2 PLUS.

En el caso de utilizar una misma membrana para detectar dos o más anticuerpos, tras un proceso de inmunodetección las membranas se incubaron con tampón de deshibridación (Tabla 6) durante 20 minutos a 80°C. Una vez terminado este proceso, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween 0,1% durante 10 minutos. Finalmente, las membranas se bloquearon de nuevo y se reinició el protocolo descrito anteriormente.

Para el análisis de las bandas de proteína las películas radiográficas se escanearon utilizando el escáner GS-900, y se densitometraron empleando el programa informático *Image Lab*.

2.5.3. Estudios de proteómica

Para los estudios de proteómica, tras el aislamiento de cardiomiocitos de ratones WT y AP realizado en el instituto de Investigación Biomédica Alberto Sols (laboratorio de Carmen Delgado) (Val-Blasco et al., 2018), se llevó a cabo la extracción de proteínas añadiendo el tampón de lisis T-PER (Invitrogen), rompiendo a continuación el sedimento celular empleando el homogeneizador *IKA Ultraturrax*, en las mismas condiciones que se indica en el apartado 2.5.1. A continuación, los lisados se centrifugaron 30 minutos a 16.000 g a una temperatura de 4°C, tomando el sobrenadante donde se encuentra la muestra de proteínas. La concentración de proteína fue determinada utilizando el método de Bradford. Finalmente, las muestras de proteína se enviaron al servicio de Proteómica del CBMSO para su posterior análisis empleando las metodologías *Label Free* y *iTRAQ Proteomics*.

En el estudio de proteómica con la tecnología *Label Free* se lleva a cabo una cuantificación de las proteínas sin establecer un marcaje previo, mientras que la tecnología *iTRAQ Proteomics* implica dicho marcaje. En ambos casos, la muestra con las proteínas en solución se somete a un proceso inicial de digestión obteniendo múltiples fragmentos. A continuación, en el procesamiento *Label Free*, estos fragmentos se pasan por el espectrómetro de masas, para posteriormente identificar todos los péptidos únicos y enfrentarlos a una base de datos de referencia para identificar a qué

proteína corresponden. Por el contrario, la metodología *iTRAQ Proteomics* introduciría en estos fragmentos un péptido de peso molecular y secuencia conocidos, que será la herramienta que permitirá la cuantificación, con mayor exactitud, de la cantidad de proteína. Por tanto, cada muestra recibiría un péptido de diferente tamaño, pasando las muestras por el espectrómetro de masas, identificando los péptidos únicos que se enfrentarán de nuevo ante una base de datos para su correcta identificación.

La cuantificación de los niveles de proteína se realizó con el software *PEAKS Studio X*, mientras que el análisis de modificaciones post-traduccionales se llevó a cabo con el software *Spider*.

2.5.4. Microarray de proteína en fase reversa (RPPma)

Para la extracción de proteína partimos de muestras de corazón completo congeladas que fueron trituradas hasta generar polvo de tejido. Para la rotura del tejido tomamos una muestra de 25-50 mg de polvo de tejido que se resuspendieron en 200 μ L del tampón de lisis T-PER (Invitrogen) y se homogeneizaron empleando el *Qiagen TissueLyser II*, sometiendo las muestras a dos ciclos de agitación de 90 segundos cada uno a una frecuencia de 20 Hz. La cuantificación de proteína se llevó a cabo mediante el método de Bradford, diluyendo las muestras en T-PER a una concentración de 0,75 mg/mL. La impresión, el procesamiento y el revelado de las muestras en el array fue realizado por el grupo del Profesor J. M. Cuezva (CBMSO, Madrid) siguiendo el protocolo descrito en Aldea et al., 2011 y utilizando el *iTWO-300p* (M2-Automation) equipado con una punta sólida a humedad y temperatura constantes. Para la realización del array, cada muestra se imprimió por duplicado. Las muestras se incubaron con anticuerpos primarios monoclonales altamente específicos (**Tabla 1**) y con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa-647. Para asegurar la calidad de la impresión y la respuesta lineal del reconocimiento de los anticuerpos usados se utilizó una curva creciente de extracto de proteínas de células C2C12 de mioblastos de ratón inmortalizados (diluido 0-1 mg/ml) y otra curva creciente de BSA (1 mg/ml) como control negativo, además de emplear una curva creciente de inmunoglobulinas de ratón (IgG) como control positivo. El revelado del array se llevó a cabo utilizando el escáner Typhoon 9410, que permite determinar la intensidad de fluorescencia, la cual será proporcional a la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo generado. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia se realizó utilizando el programa Fiji (N.I.H., USA), para a continuación convertir las unidades arbitrarias en cantidad de proteína utilizando la ecuación obtenida de la recta patrón estándar de las células C2C12, normalizando frente a FCF (*Fast Green FCF*) como control de carga.

2.6. Estudios *in vivo*

2.6.1. Ecocardiograma de ratón

Para el análisis de la función cardíaca, se realizó una ecocardiografía transtorácica por un operador experto del servicio de imagen del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), utilizando un sistema de ultrasonidos de alta frecuencia (Vevo 2100, Visualsonics Inc., Canadá) con una sonda lineal de 40 MHz. Los métodos empleados para la ecocardiografía son los denominados métodos bidimensional y de Modo M, realizados a una velocidad de fotogramas de aproximadamente 230 fotogramas por segundo, mientras que el pulso de onda de Doppler fue adquirido con una frecuencia de repetición de pulso de 40 KHz. Para realizar el ecocardiograma, se anestesiaron los ratones con isofluorano al 1-2% en oxígeno, ajustando la cantidad de isofluorano administrada para mantener la frecuencia cardíaca de los ratones en 450 ± 50 pulsaciones por minuto. Los ratones se colocaron en posición supina sobre una plataforma de calor que mantenía la temperatura constante en 37°C, además de emplear para realizar el ecocardiograma un gel atemperado, permitiendo así mantener la normotermia de los animales. Las imágenes obtenidas del estudio fueron transferidas a un ordenador y analizadas utilizando el software Vevo 2100 Workstation.

Para determinar la función sistólica del ventrículo izquierdo se empleó el análisis de vista de imágenes del eje largo (LAX), obteniendo los valores para la fracción de eyección, la fracción de acortamiento y las dimensiones del ventrículo izquierdo. Por otra parte, a través del pulso de onda de Doppler se permite calcular el flujo a través de la válvula mitral y por consiguiente la función diastólica. Con este método también se calcularon otros parámetros referentes a la funcionalidad cardíaca, como las velocidades diastólicas E y A, así como el tiempo de relajación isovolumétrica.

2.6.2. Tratamiento con antimir-208a

Para estudiar el potencial terapéutico de la modulación de los miRNAs, 9 ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) de 15 semanas de edad se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos de tratamiento: 4 ratones para el tratamiento con el LNA control y 5 para el LNA dirigido contra el miR-208a. El tratamiento consistió en 3 inyecciones subcutáneas con el LNA correspondiente a una concentración de 20 mg/kg/día durante 3 días consecutivos, manteniendo después los ratones durante 5 semanas más, tiempo estimado por otros grupos de investigación como suficiente para provocar la inhibición en la expresión del miRNA. Transcurridas estas 5 semanas, los ratones se sometieron a un estudio por ecocardiograma en el servicio imagen del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), previamente referido. Una vez concluido el estudio, los ratones se sacrificaron empleando para ello el método de dislocación cervical, aislando los

corazones que fueron inmediatamente congelados en N₂ líquido y almacenados a -80°C hasta su posterior uso.

2.6.3. Tratamiento con bezafibrato

Los ratones WT y *Pcca*^{-/-} (A138T) se sometieron a un tratamiento dietético con el fármaco bezafibrato al 0,5% mezclado con el pienso común de los ratones. A este porcentaje se sabe que la toxicidad del fármaco es fundamentalmente hepática pero no afecta a ningún otro tipo de parámetro bioquímico. El tratamiento se realizó durante cuatro meses, alcanzando una edad de 36 semanas, renovando el pienso con bezafibrato o el pienso control semanalmente. Asimismo, los ratones fueron sometidos a un seguimiento semanal de su peso. Una vez concluido el tratamiento, los ratones se anestesiaron con xilacina 7% y ketamina 7% para proceder a su perfusión con una solución salina y sacrificado. A continuación, se tomaron muestras de corazón, cerebro e hígado que se congelaron de forma inmediata en N₂ líquido y se almacenaron posteriormente a -80°C hasta su posterior uso.

2.7. Análisis estadístico

Los datos del trabajo se presentan como la media \pm la desviación estándar. Para analizar las diferencias significativas en ensayos con dos grupos, las muestras fueron comparadas utilizando el test estadístico de la T-student; mientras que en el caso de ensayos con 3 o más grupos, el análisis se llevó a cabo utilizando el test estadístico ANOVA seguido de la correspondiente prueba post hoc: *Tukey's honestly significant differences* o *Games Howell post hoc test*. Todas las muestras fueron analizadas utilizando el programa estadístico SPSS. Se consideraron como estadísticamente significativos todos aquellos p valores inferiores a 0,05: **P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,001.

RESULTADOS

1. Caracterización de la fisiopatología cardíaca en el modelo murino *Pcca*^{-/-} (A138T)

La AP es una enfermedad multisistémica que cursa con una sintomatología clínica muy variada, en la que destacan, entre otras, las cardiomiopatías como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (Richard et al., 2015), aunque aún se desconocen los mecanismos fisiopatológicos que provocan su desarrollo. Por ello, en este trabajo nos hemos centrado en analizar las alteraciones fisiológicas y moleculares en el corazón del modelo murino de AP mediante estudios ecocardiográficos, transcriptómicos dirigidos y proteómicos.

1.1. Análisis de la función cardíaca por ecocardiograma

Con el objetivo de caracterizar el fenotipo cardíaco de los ratones AP, se llevaron a cabo una serie de estudios por ecocardiograma en ratones WT (n=6) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=7) a 5 y 8 meses de edad. El análisis por ecocardiograma aportó información relevante acerca de parámetros referentes a la estructura cardíaca, como se recoge en la **Tabla 11**. Pese a que no se observaron diferencias significativas en la masa del corazón, los resultados muestran un incremento del tamaño de la pared del septo interventricular (IVSd) en diástole a 5 y 8 meses, así como un incremento a 5 meses del tamaño de la pared posterior del ventrículo izquierdo (LVPW) en ratones hipomorfos, lo que podría ser indicativo de un remodelado cardíaco. Asimismo, la **Figura 8A** muestra un incremento significativo del diámetro interno del ventrículo izquierdo (LVID) en los ratones AP al compararlos con ratones WT. Todos estos parámetros fueron normalizados con respecto al peso del ratón para corregir la variabilidad entre individuos.

Tabla 11: Datos del análisis por ecocardiograma en ratones WT y AP

Genotipo	Edad	IVSd/Peso	LVPW/Peso	Masa VL/Peso	LV Vol (s)	LV Vol (d)
WT	5 meses	0,022 ± 0,0015	0,022 ± 0,0007	3,06 ± 0,34	29,82 ± 5,30	82,29 ± 9,52
<i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T)	5 meses	0,025 ± 0,0038	0,025 ± 0,0028 (*)	3,09 ± 0,31	25,89 ± 4,92	70,58 ± 5,21 (*)
WT	8 meses	0,021 ± 0,0015	0,02 ± 0,0024	3,08 ± 0,25	34,48 ± 6,65	94,19 ± 8,28
<i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T)	8 meses	0,024 ± 0,002 (**)	0,02 ± 0,003	3,33 ± 0,3	37,47 ± 8,4	85,98 ± 5,1 (*)

Pie de tabla. El término IVSd (*Interventricular septum thickness at end-diastole*) hace referencia al diámetro del septo interventricular en diástole; el LVPW (*Left ventricular posterior wall thickness at end-systole*) marca el diámetro de la pared posterior del ventrículo izquierdo; y los términos LV Vol (s) y LV Vol (d) representan los volúmenes telesistólico y telediastólico respectivamente. El símbolo * determina la significancia estadística analizada por el test de la t de Student: **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

Con respecto a la función cardiaca, se observa una disminución significativa a 5 y 8 meses en el volumen telediastólico (LV Vol (d) en la **Tabla 11**) en los ratones AP al compararlos con la condición control. Este hecho se ve reflejado en las **Figuras 8B y 8C**, donde se puede observar una tendencia de disminución progresiva en la fracción de eyección (FE) y la fracción de acortamiento (FS), aunque sin llegar a tener significancia estadística. Finalmente, el parámetro E/A, indicativo de función diastólica, muestra como hay un mayor número de ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) fuera del rango de normalidad (1,1-2,2) a 5 y 8 meses (71% y 86% respectivamente) que en la condición control (33% y 50% respectivamente).

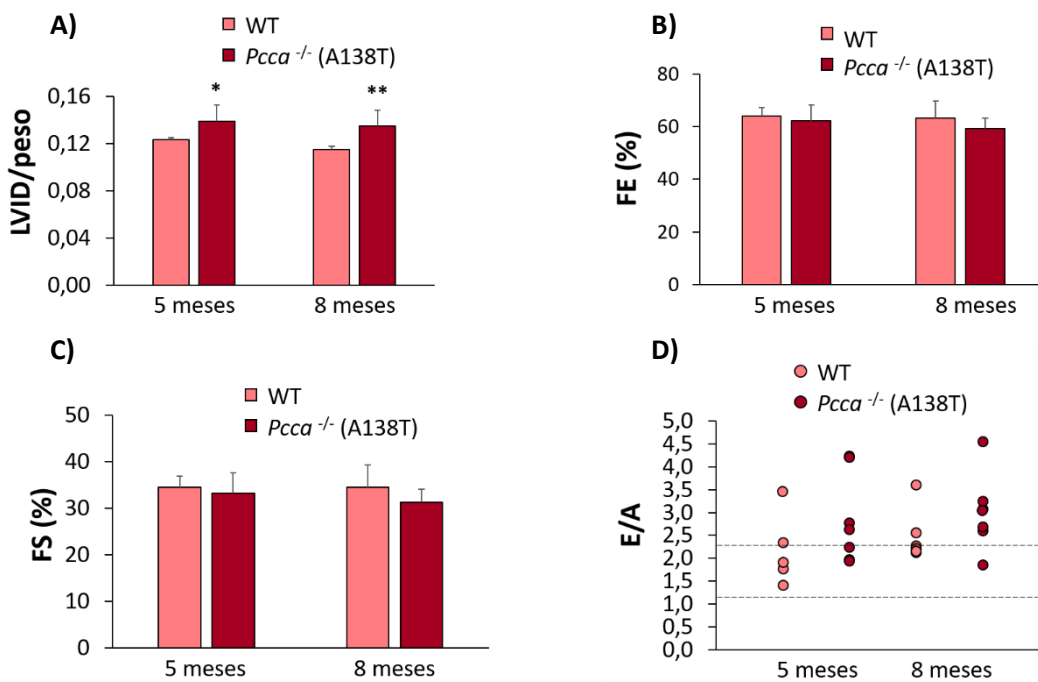


Figura 8. Análisis de la función cardiaca por ecocardiograma longitudinal de modo M en ratones AP. Las medidas del (A) diámetro interno del ventrículo izquierdo (LVID), (B) fracción de eyección (FE), (C) fracción de acortamiento (FS) y (D) función diastólica (E/A) se analizaron en ratones AP (n=7) en comparación con ratones WT (n=6) a 5 y 8 meses de edad. El parámetro LVID fue normalizado con respecto al peso de cada ratón. Los histogramas recogen los datos en forma de media y desviación estándar, mientras que el diagrama de dispersión para E/A muestra cada ratón individualizado. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por la t de Student: **p* < 0,05; ***p* < 0,01.

1.2. Análisis de la expresión de los marcadores de daño cardiaco y colágenos

Los péptidos natriuréticos del atrio y del cerebro (ANP y BNP, respectivamente) son dos hormonas circulantes que desempeñan una serie de funciones destinadas a reducir la tensión arterial y mejorar la funcionalidad cardiaca (Nishikimi, Maeda & Matsuoka, 2006), por lo que su expresión y liberación al torrente circulatorio aumenta en condiciones patológicas. Asimismo, un aumento en la expresión de la isoforma β de la cadena pesada de la miosina en corazón (β -MHC)

se considera indicativo de desarrollo de cardiomiopatías en modelos de ratón (Harvey, Leinwand, 2011). Por ello, un incremento en la expresión de los genes correspondientes (*Nppa*, *Nppb* y *Myh7*) podría ser indicativo de la presencia de daño cardíaco en el ratón AP. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la expresión de estos marcadores a distintas edades (2, 5 y 10 meses). Nuestros resultados muestran un incremento significativo en la expresión de estos tres marcadores a 5 meses de edad en los ratones AP en comparación con la condición control (Figura 9A), lo que confirmaría la presencia de daño cardíaco en el ratón AP. Esta desregulación en cambio no es tan evidente en el resto de edades, observando ligeras variaciones, sin alcanzar significancia estadística (datos no mostrados).

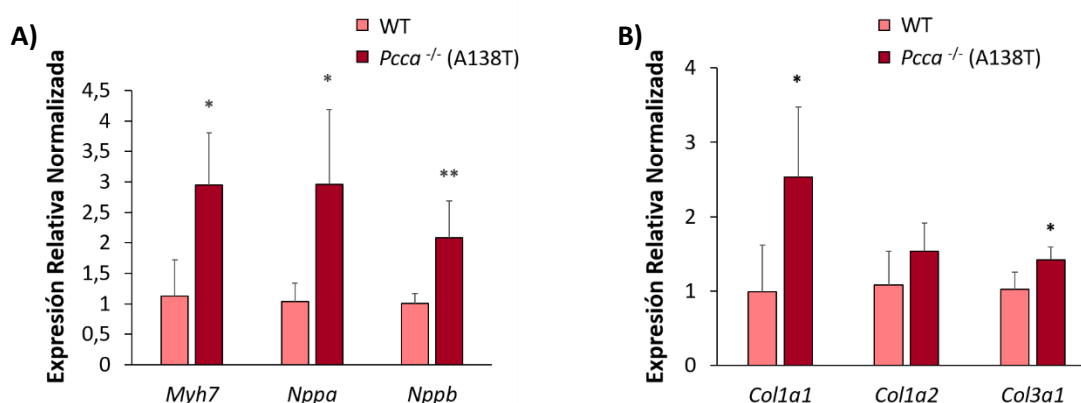


Figura 9. Estudio de expresión relativa de marcadores de daño cardíaco y colágenos. El análisis de expresión de los genes marcadores de daño cardíaco (A) y de los colágenos (B) como marcadores de fibrosis se llevó a cabo mediante qRT-PCR en el corazón de ratones WT (n=5) y ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=5) a 5 meses de edad. La expresión relativa de cada uno de los genes fue calculada utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el gen *Gapdh* como control de expresión constitutiva. Los histogramas representan los datos en forma de media y desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por la t de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Por otra parte, un aumento en la expresión de los genes codificantes de las distintas variedades de colágenos se ha asociado con un aumento en la fibrosis, característica presente en distintos tipos de cardiopatías (Modesto, Sengupta, 2014, Sisakian, 2014). Para evaluar la posible aparición de fibrosis cardíaca en el modelo murino de AP, se estudió por qRT-PCR la expresión de los genes *Col1a1*, *Col1a2* y *Col3a1*, detectando un incremento de la expresión de los marcadores de fibrosis *Col1a1* y *Col3a1* a 5 meses de edad en el corazón de los ratones AP (Figura 9B).

1.3. Estudios proteómicos

Una de las alteraciones cardíacas frecuentes presentes en los pacientes de AP es el desarrollo de arritmias. Para completar el estudio de alteraciones cardíacas en el modelo murino de AP, se llevó a cabo un análisis de la función cardíaca y electrofisiológica en el corazón del ratón AP, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Carmen Delgado (IIB Alberto Sols, Madrid). Para ello, se seleccionaron ratones de 8 meses de edad, ya que mostraban una mayor alteración en la función cardíaca, y se sometieron en primer lugar a un estudio por resonancia magnética que confirmó la presencia de patología cardíaca mostrando una disminución de la capacidad contráctil del corazón. A continuación, el equipo del IIB realizó una serie de estudios por microscopía confocal en cardiomiocitos aislados del corazón de ratones AP que confirmaron una alteración en el manejo del Ca^{2+} intracelular, lo que provocaría la presencia de eventos pro-arritmogénicos.

La contracción cardíaca es un proceso dependiente de la acción de varias proteínas que ejercen distintas funciones, como regular los niveles de Ca^{2+} intracelular, producción de energía en forma de ATP, formación de estructuras de anclaje, etc. Por tanto, y teniendo en cuenta los resultados anteriores, planteamos un análisis de proteómica en el corazón del ratón AP para estudiar el perfil de proteínas y sus modificaciones post-traduccionales que pudieran estar contribuyendo al desarrollo de cardiomiopatías en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T), en especial de aquellas implicadas en el manejo del Ca^{2+} intracelular.

Para ello, se trabajó con muestras de proteína obtenidas de cardiomiocitos individualizados que se agruparon en dos *pools* por condición (WT y AP, n=4). El análisis proteómico se llevó a cabo mediante la tecnología *iTRAQ Proteomics* en el servicio de proteómica del CBMSO. Una vez aplicados los filtros adecuados, se identificaron significativamente un total de 90 proteínas, de las cuales 68 presentaban un perfil de expresión diferente entre ambas condiciones, destacando la alteración en los niveles de proteínas implicadas en rutas de metabolismo energético (β -oxidación de ácidos grasos, glucólisis o ciclo de Krebs), apoptosis, integridad mitocondrial, o proteínas que desempeñan funciones como antioxidantes, chaperonas o soporte celular, entre otras (**Figura 10**). Algunas de las proteínas que presentan mayores diferencias de expresión se recogen en la **Tabla 12**, destacando proteínas como la succinil-CoA ligasa (0,84) o la fosfoglicerato kinasa 1 (0,83), implicadas en el ciclo de Krebs y glucólisis respectivamente, o proteínas estructurales o contráctiles importantes para la formación de los sarcómeros, como pueden ser la proteína 5 del dominio PDZ y LIM (0,68), la nebulina (0,74), la α -actinina 2 (0,79) y la cadena ligera reguladora de miosina 2 (3,56).

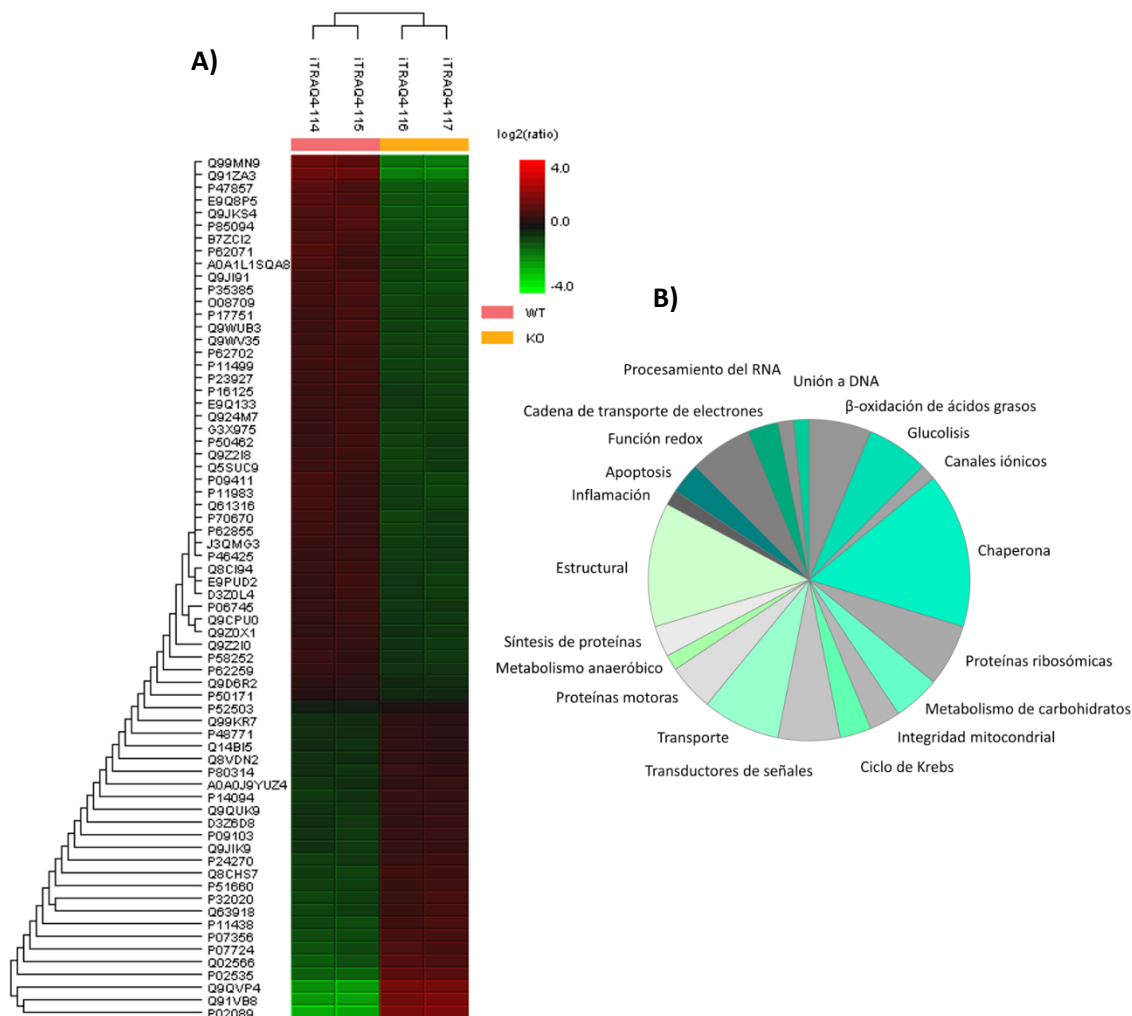


Figura 10. Estudio del proteoma de cardiomiocitos en el modelo murino de AP mediante la tecnología *iTRAQ Proteomics*. Mapa de calor de la expresión diferencial relativa de proteínas entre las condiciones WT (n=4) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=4) (A) agrupadas en 2 *pools* por condición. El algoritmo cuantifica la medición como el \log_2 de la cantidad del péptido frente a la cantidad media. Representación gráfica de las rutas y/o funciones en que se agrupan las proteínas identificadas (B).

Sin embargo, la tecnología *iTRAQ Proteomics* presenta un inconveniente metodológico, ya que en el marcaje de los péptidos existe un fondo residual, lo que atenúa las diferencias entre las muestras. Esto se ve reflejado en la [Tabla 12](#), donde los niveles detectados de las isoformas α y β de la PCC son mayores a los esperados, dado que en el modelo murino de AP no hay proteína PCCA detectable por *western blot* (WB), lo que provoca la inestabilidad de la proteína PCCB que se degrada y tampoco es detectable, como se ha descrito en fibroblastos de pacientes (Lam Hon Wah et al., 1983).

Tabla 12: Proteínas identificadas por iTRAQ Proteomics en el corazón del modelo murino de AP

Nombre	Gen	Ratio KO:WT	Función
Propionil-CoA carboxilasa α	<i>Pcca</i>	0,39	Metabolismo de AG y proteínas
Propionil-CoA carboxilasa β	<i>Pccb</i>	0,45	Metabolismo de AG y proteínas
Fosfofructokinasa 6	<i>Pfkm</i>	0,66	Glucolisis
Proteína 5 del dominio PDZ y LIM	<i>Pdlim5</i>	0,68	Estructural
Proteína 3 de unión a LIM	<i>Ldb3</i>	0,7	Estructural
Nebuleta	<i>Nebl</i>	0,74	Estructural
Proteína ribosómica 25S	<i>Rps25</i>	0,78	Proteína ribosómica
α -actinina 2	<i>Actn2</i>	0,79	Estructural
Glucógeno fosforilasa	<i>Pygm</i>	0,81	Metabolismo de carbohidratos
Triosa fosfato isomerasa	<i>Tpi1</i>	0,81	Glucolisis
Proteína ribosómica 4S	<i>Rps4x</i>	0,82	Proteína ribosómica
Fosfoglicerato Kinasa 1	<i>Pgk1</i>	0,83	Glucolisis
α -cristalina B	<i>Cryab</i>	0,83	Chaperona
Succinil-CoA ligasa	<i>Suclg2</i>	0,84	Ciclo de Krebs
Lactato deshidrogenasa B	<i>Ldhb</i>	0,85	Metabolismo anaeróbico
Manosa 6 fosfato isomerasa	<i>Mpi</i>	0,85	Metabolismo de carbohidratos
Oxidorreductasa 7C	<i>Dhrs7c</i>	1,2	Oxidorreductasa
Proteína transportadora de esteroides 2 C	<i>Scp2</i>	1,21	Transporte de lípidos
Anexina A2	<i>Anxa2</i>	1,31	Transductor
α -MHC	<i>Myh6</i>	1,46	Proteína motora
Cadena ligera de la miosina	<i>Myl7</i>	3,56	Proteína motora

Con respecto a las proteínas implicadas en el manejo del Ca^{2+} , se detectaron varias proteínas implicadas en esta función, sin embargo, en ningún caso se observaron diferencias en sus niveles de expresión. Por ello, decidimos analizar si existían diferencias en el patrón de modificaciones post-traduccionales en estas proteínas que pudieran afectar a su función. Para ello se llevó a cabo un análisis mediante la tecnología *Label Free*, que además permite eliminar el fondo residual entre muestras al no producir un marcaje de los péptidos. En este análisis las muestras se agruparon en un único grupo por condición (ratones control y ratones AP), observando unas diferencias globales de expresión de proteínas semejantes a la anterior (datos no mostrados). Asimismo, se identificaron 3 proteínas cuya función está relacionada con el manejo del calcio y la contracción muscular: SERCA2a, CaMKII δ y RyR. En el análisis de las modificaciones post-traduccionales de estas proteínas no se detectó ningún tipo de alteración post-traduccionales para la CaMKII δ y RyR, mientras que en el caso de SERCA2a se observó un incremento en la oxidación y detiometilación (proceso

que consiste en un segundo paso de oxidación en grupos tioles) en determinados residuos de metionina (Figura 11).

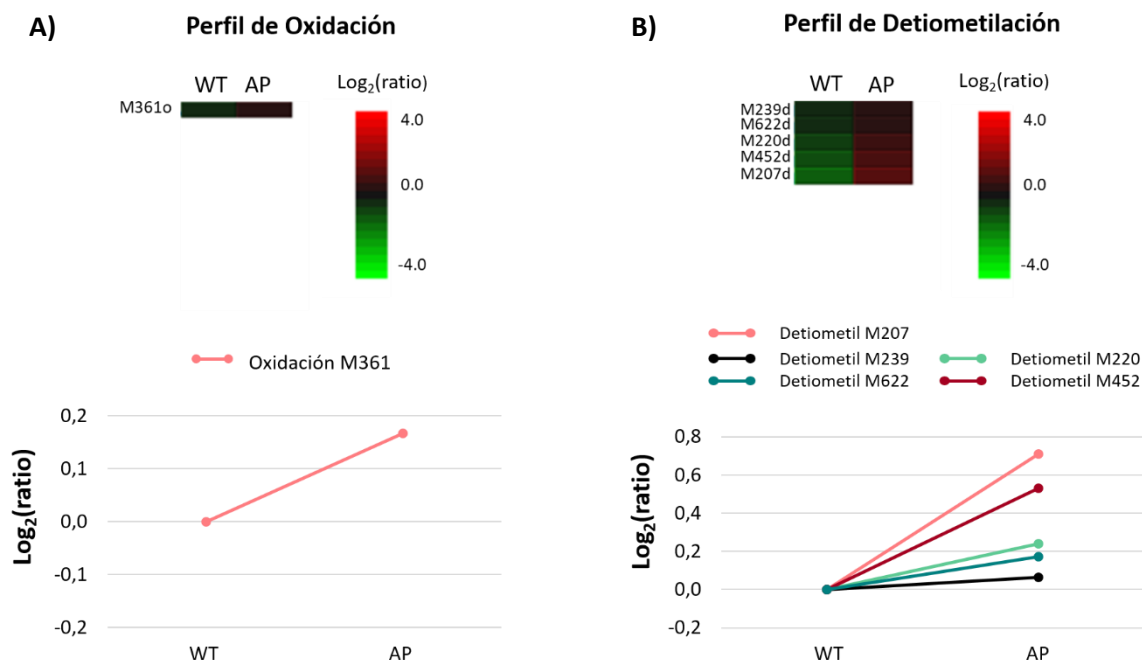


Figura 11. Análisis de las modificaciones post-traduccionales en la proteína SERCA2a de cardiomiocitos del modelo murino de AP. Representación de los perfiles de oxidación (A) y detiometilación (B) de la proteína SERCA2a en *pools* de cardiomiocitos obtenidos de ratones WT (N=1; n=4) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (N=1; n=4). Se representa el mapa de calor indicativo de la variación relativa de los péptidos entre las condiciones. El algoritmo calcula la medición como el Log₂ de la cantidad del péptido frente a la cantidad media.

1.4. Estudio de vías de señalización implicadas en el desarrollo de cardiomiopatías

Previo al desarrollo de la cardiomiopatía, el corazón presenta una respuesta adaptativa para intentar responder de forma adecuada a una nueva situación. No obstante, de persistir el estímulo, se activan múltiples cascadas de señalización que modificarían el comportamiento bioquímico y metabólico del cardiomiocito, dando como resultado el establecimiento de la patología cardiaca (Tham et al., 2015). En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de las vías de señalización PI3K-AKT (Aoyagi, Matsui, 2011) y de la activación de las kinasas de estrés (Molkentin, 2004), ambas descritas en la literatura como asociadas con remodelado cardiaco.

1.4.1. Análisis de expresión de genes de la vía PI3K-AKT

Para el análisis de la vía de señalización de PI3K-AKT partimos de muestras de RNA procedente de corazón de 8 ratones AP y 8 ratones control. Tras la retrotranscripción, las muestras se agruparon en cuatro grupos por condición, y se analizaron por qPCR en un panel de expresión génica de 84 genes implicados en dicha ruta de señalización, que participa en el control de procesos tales como metabolismo, inflamación, supervivencia, crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Nuestros resultados muestran una clara desregulación en la expresión de 33 de los 84 genes analizados (Figura 12), pudiendo observar cómo genes activadores de supervivencia y proliferación, o relacionados con daño cardíaco (*Jun*, *Eif4b* o *Pak1*; *Fos*, *Tcl1*, *Pik3ca* o *Mtor*) e inflamación (*Tirap* o *Myd88*) presentan un incremento en su expresión, mientras que en genes supresores de esta vía (*Pten*, *Grb10* o *Tsc2*) e inhibidores de inflamación (*Chuk*, *Irak1* o *Nfkbi*) se observa un descenso en sus niveles de expresión.

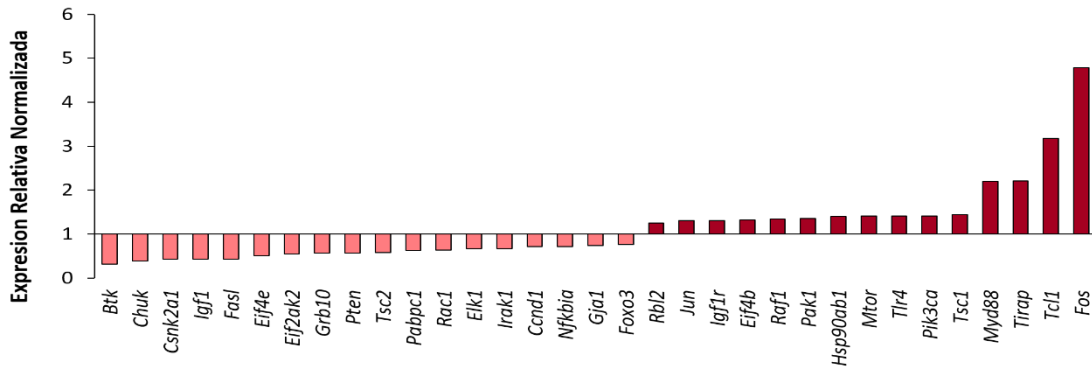


Figura 12. Genes de la vía de señalización PI3K-AKT desregulados en corazón de ratones AP. Se analizó la expresión relativa por qRT-PCR de 84 genes implicados en la ruta de señalización de PI3K-AKT en muestras de corazón de ratones WT (n=8) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=8) agrupadas en 4 grupos por condición, a 5 meses de edad. Los resultados de expresión relativa de cada gen se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando un grupo de 5 genes (*Gapdh*, *B2m*, *Actb*, *Ywhah* y *Gusb*) como controles de expresión constitutiva. Los datos se representan en forma de la media de los grupos analizados.

1.4.2. Estudio de la activación de las kinasas de estrés p38 y JNK

Con respecto a la activación de las kinasas de estrés, se ha descrito que variaciones en sus niveles de activación pueden conducir al desarrollo de cardiomiopatías (van Berlo, Maillet & Molkenin, 2013). Para analizar la activación de p38 y JNK, se estudiaron por WB los niveles de las proteínas fosforilada y total en corazón de ratones WT y AP. Los resultados (Figura 13) muestran una ausencia total en la activación de p38 en las muestras de los ratones AP en comparación con las de los ratones WT, mientras que en el caso de JNK se aprecia una disminución en la fosforilación de esta

proteína en el modelo murino de la enfermedad, que también viene acompañada por una disminución de la ratio P-JNK/JNK, aunque no alcanza significancia estadística.

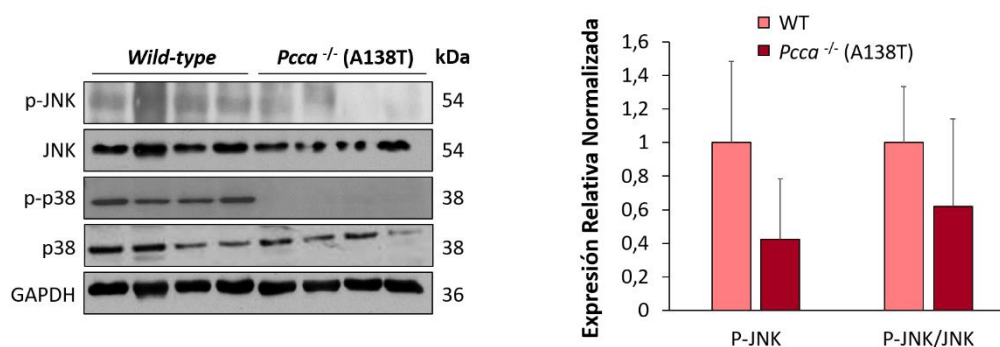


Figura 13. Análisis del estado de activación de las quinasas de estrés JNK y p38. Western blots representativos para la detección de la fosforilación de las proteínas JNK y p38, en el corazón de los ratones WT (n=4) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=4) a 5 meses de edad. El histograma muestra los datos en forma de media y desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda para la fosforilación de JNK y la ratio entre la forma fosforilada y la forma total de la proteína.

2. Expresión de miRNAs potencialmente implicados en la fisiopatología cardíaca en AP

Como hemos comentado en la introducción, una alteración en los niveles de los miRNAs podría contribuir al desarrollo de diferentes patologías, habiendo estudios previos que asocian la desregulación de miRNAs con enfermedades neurodegenerativas (Cao, Li & Chan, 2016, Minones-Moyano et al., 2011), cáncer (Di Leva, Garofalo & Croce, 2014) o patologías cardiovasculares (Condorelli, Latronico & Cavarretta, 2014, Wang, H., Cai, 2017). Por esta razón, se decidió analizar la posible implicación de miRNAs en el desarrollo de la sintomatología cardíaca en el modelo murino de AP y su correlación con el estudio de miRNAs circulantes en pacientes.

2.1. Análisis de miRNAs específicos de corazón o cardiomiRs en el modelo murino de AP

Durante el desarrollo de cardiomiopatías como la CH o la DCM, se produce la activación o inhibición de rutas de señalización que provocarían finalmente un remodelado cardíaco (Haque, Wang, 2017). Entre las rutas que pueden desregularse aparecen aquellas implicadas en crecimiento, supervivencia celular o apoptosis y fibrosis. Por esta razón, una desregulación en los niveles de miRNAs específicos de corazón o cardiomiRs que regulen estas vías podrían contribuir al establecimiento de la patología cardíaca (Wang, J. et al., 2016). En este trabajo nos hemos centrado en el análisis de cardiomiRs seleccionados en el modelo murino de AP.

2.1.1. Estudio de expresión de cardiomiRs

Para el análisis de expresión de cardiomiRs se realizó inicialmente una búsqueda bibliográfica en *Pubmed* y en la plataforma bioinformática *mirWalk 2.0*, que permite buscar miRNAs potencialmente implicados en determinadas rutas de señalización. Del conjunto de miRNAs identificados que se relacionan con hipertrofia, apoptosis o fibrosis, se seleccionaron 15 (**Tabla 13**) de los cuales 14 de ellos son considerados cardiomiRs o de expresión mayoritaria en corazón, mientras que, en el caso del miR-338-3p que cuenta con una expresión más distribuida entre tejidos, se seleccionó por su participación en la regulación de complejos de la CTE (Aschrafi et al., 2008), que presenta alteraciones en el corazón del modelo murino de AP (Gallego-Villar et al., 2016).

Tabla 13: miRNAs analizados en el corazón del modelo murino de AP

miRNA	Dianas validadas	Papel en cardiopatías	Vía de señalización	Referencias
miR-1a-3p	IGF1-R BCL2 B56 α MEF2A	Hipertrofia Apoptosis Arritmias Fibrosis	PI3K/AKT	(Ikeda et al., 2009, Tang et al., 2009, Zhao, Y. et al., 2007)
miR-22-3p	SIRT1 HDAC4 PTEN TGF β R I	Hipertrofia Apoptosis Fibrosis	PI3K/AKT	(Hong et al., 2016, Huang, Z. P. et al., 2013, Xu et al., 2012)
miR-23a-3p	muRF1 FOXO3A	Hipertrofia	CaN/NFAT	(Lin et al., 2009, Wang, K. et al., 2012)
miR-25-3p	HAND2 SERCA2a	Apoptosis	Homeostasis del Ca ²⁺	(Pan et al., 2015)
miR-29a-3p	COL3A1 CO1A1 COL1A2	Fibrosis	-	(van Rooij et al., 2008)
miR-30c-5p	p53 DRP1	Apoptosis	p53	(Li, J. et al., 2010)
miR-133a-3p	Caspasa 9 TGF- β 1 RHOA	Apoptosis Fibrosis Hipertrofia	MAPK PI3K/AKT	(Care et al., 2007, Li, N., Zhou & Tang, 2018)
miR-199a-5p	PPAR δ GSK3B	Hipertrofia Apoptosis	PI3K/AKT mTOR	(el Azzouzi et al., 2013, Li, Z. et al., 2017)
miR-199b-5p	DYRK1	Hipertrofia Fibrosis	CaN/NFAT	(da Costa Martins et al., 2010)
miR-208a-3p	MED13 Miostatina	Hipertrofia fibrosis	-	(Callis et al., 2009, van Rooij et al., 2009, Wang, B. W. et al., 2014)
miR-328-3p	SERCA2a	Hipertrofia	Homeostasis del Ca ²⁺	(Li, C. et al., 2014)
miR-338-3p	ATP5G1	-	OXPPOS	(Aschrafi et al., 2008)
miR-350-3p	p38 JNK	Hipetrofia	MAPK	(Ge et al., 2013)
miR-378-3p	Caspasa 3 IGF1R	Apoptosis Hipertrofia	MAPK PI3K/AKT	(Fang et al., 2012, Ganesan et al., 2013)
miR-499a-5p	CnA	Hipertrofia Apoptosis	CaN/NFAT	(Wang, J. X. et al., 2011)

A continuación, para estudiar su posible implicación en la fisiopatología cardiaca de AP, se analizó la expresión relativa por qRT-PCR de los 15 miRNAs en el modelo murino de la enfermedad (n=5) a cinco meses de edad, normalizando frente a la condición WT (n=5). Los resultados mostrados en la **Figura 14** reflejan como 13 de los 15 miRNAs analizados presentan un incremento significativo en sus niveles, con particular interés en el miR-22-3p, miR-199a-5p, miR-199b-5p y 208a-3p por su elevada sobreexpresión.

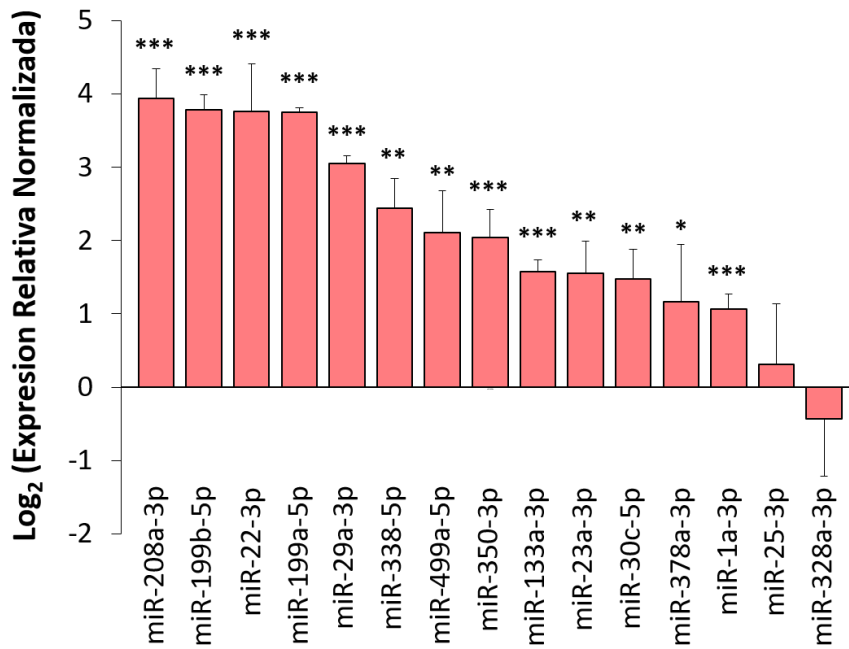


Figura 14. Expresión de miRNAs seleccionados en corazón del modelo murino de AP. Los niveles de expresión de los miRNAs se analizaron por qRT-PCR en el corazón de los ratones WT (n=5) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=5) a 5 meses de edad. La expresión relativa de cada miRNA se calculó a través del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el snRNA U6 y el miR-423-3p como controles de expresión constitutiva. Los datos se representan como la media y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por la t de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Una vez analizado el patrón de expresión de los miRNAs a cinco meses de edad, se seleccionaron el miR-199a-5p y miR-208a-3p, dos de los miRNAs que presentan una mayor sobreexpresión, para un análisis posterior de sus niveles a distintas edades (2 y 10 meses). Los resultados obtenidos muestran que a 2 meses se produce un incremento en la expresión del miR-208a-3p de 3 veces en el ratón *Pcca*^{-/-} (A138T) en comparación con el WT, mientras que a 10 meses se observa una reducción en los niveles del miR-208a-3p en el modelo murino de AP (**Figura 15**). Con respecto al miR-199a-5p, se observa un patrón similar al miR-208a-3p, pero en este caso las diferencias no alcanzan significancia estadística.

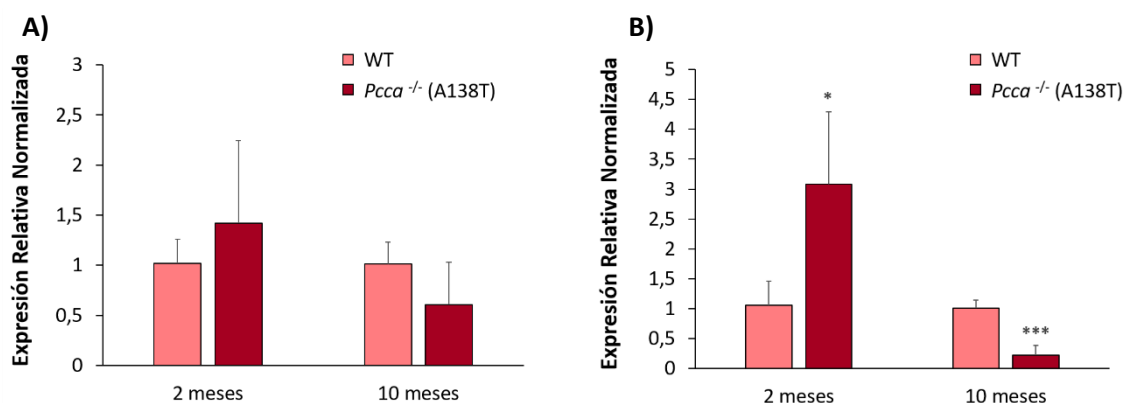


Figura 15. Expresión del miR-199a-5p y miR-208a-3p en el corazón del modelo murino de AP a distintas edades. Los niveles de expresión del miR-199a-5p (A) y miR-208a-3p (B) se analizaron por qRT-PCR en el corazón de los ratones WT y *Pcca*^{-/-} (A138T) a 2 (n=4, por grupo) y 10 (n=5, por grupo) meses de edad. La expresión relativa se calculó a través del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el snRNA U6 y el miR-423-3p como controles de expresión constitutiva. Los datos se representan como la media y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por la t de Student: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

2.1.2. Análisis de las dianas potenciales de los cardiomiRs

Una vez identificada la alteración en los niveles de expresión de los cardiomiRs, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica en *Pubmed* y se consultaron las bases de datos *TargetScan* y *miRTarBase* para identificar las dianas potenciales de estos miRNAs, ya validadas en algún sistema o modelo de patología (Tabla 13). Debido a que, teóricamente, la acción del miRNA puede suponer una degradación del mRNA o bien una inhibición de su traducción, los efectos en las dianas pueden analizarse a nivel de RNA mediante qRT-PCR o bien a nivel de expresión de proteína mediante WB. De este modo escogimos para su estudio dianas potenciales de los miRNAs desregulados que participan en rutas de señalización implicadas en el desarrollo de patologías cardiacas (Callis et al., 2009, Lin et al., 2009), o bien regulan procesos fundamentales como apoptosis (Li, N., Zhou & Tang, 2018) o función mitocondrial (el Azzouzi et al., 2013), y/o para las que había anticuerpos disponibles que se testaron previamente.

Así, se analizaron los niveles de expresión de *Ppard* y *Med13*, dianas potenciales del miR-199a-5p y miR-208a-3p respectivamente, por qRT-PCR. El gen *Ppard* fue seleccionado por su implicación como regulador del metabolismo lipídico, ya que en cardiomiopatías se produce un cambio metabólico hacia el consumo de glucosa en detrimento de ácidos grasos; mientras que *Med13* se seleccionó por su papel como represor transcripcional del gen *Myh7* que codifica para la proteína β -MHC, la cual se expresa de forma mayoritaria en condiciones de CH en ratones, y que previamente habíamos detectado también aumentada en corazón (Figura 9A). Los resultados obtenidos en el corazón de los ratones AP a cinco meses de edad muestra un descenso en los niveles

de ambos genes al normalizar frente a los ratones control, alcanzando la significancia estadística solo en el caso del gen *Ppard* (Figura 16).

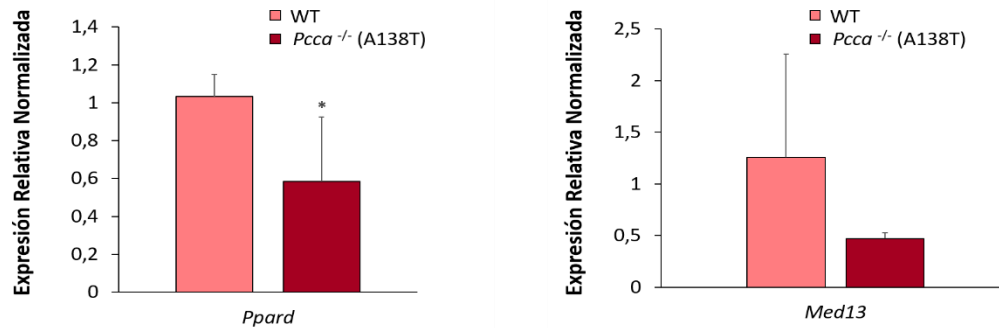


Figura 16. Análisis de la expresión de las dianas potenciales del miR-199a-5p y miR-208a-3p. El análisis de los genes *Ppard* y *Med13* se llevó a cabo mediante qRT-PCR en el corazón de los ratones WT (n=5) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=5) a 5 meses de edad. La expresión relativa de los genes se realizó a través del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el gen *Gapdh* como control endógeno. Cada histograma recoge los datos representados como la media y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por la t de Student: * $p < 0,05$.

En relación a los miRNAs restantes, se seleccionaron las proteínas muRF1 (diana del miR-23a-3p), una ubiquitina ligasa con función represora de crecimiento hipertrófico, las caspasas 3 y 9 (dianas del miR-378a-3p y miR-133a-3p, respectivamente), la ATP5G1 (diana del miR-338-3p), y las kinasas de estrés p38 y JNK (dianas del miR-350-3p) para su análisis por WB. Los resultados de este estudio muestran como en el corazón de los ratones AP a 5 meses la mayoría de estas proteínas aparecen disminuidas, y se observa un descenso significativo de las caspasas 3 y 9, así como de las proteínas p38 y ATP5G1 (Figura 17), en concordancia con los niveles aumentados que se detectan para los miRNAs correspondientes.

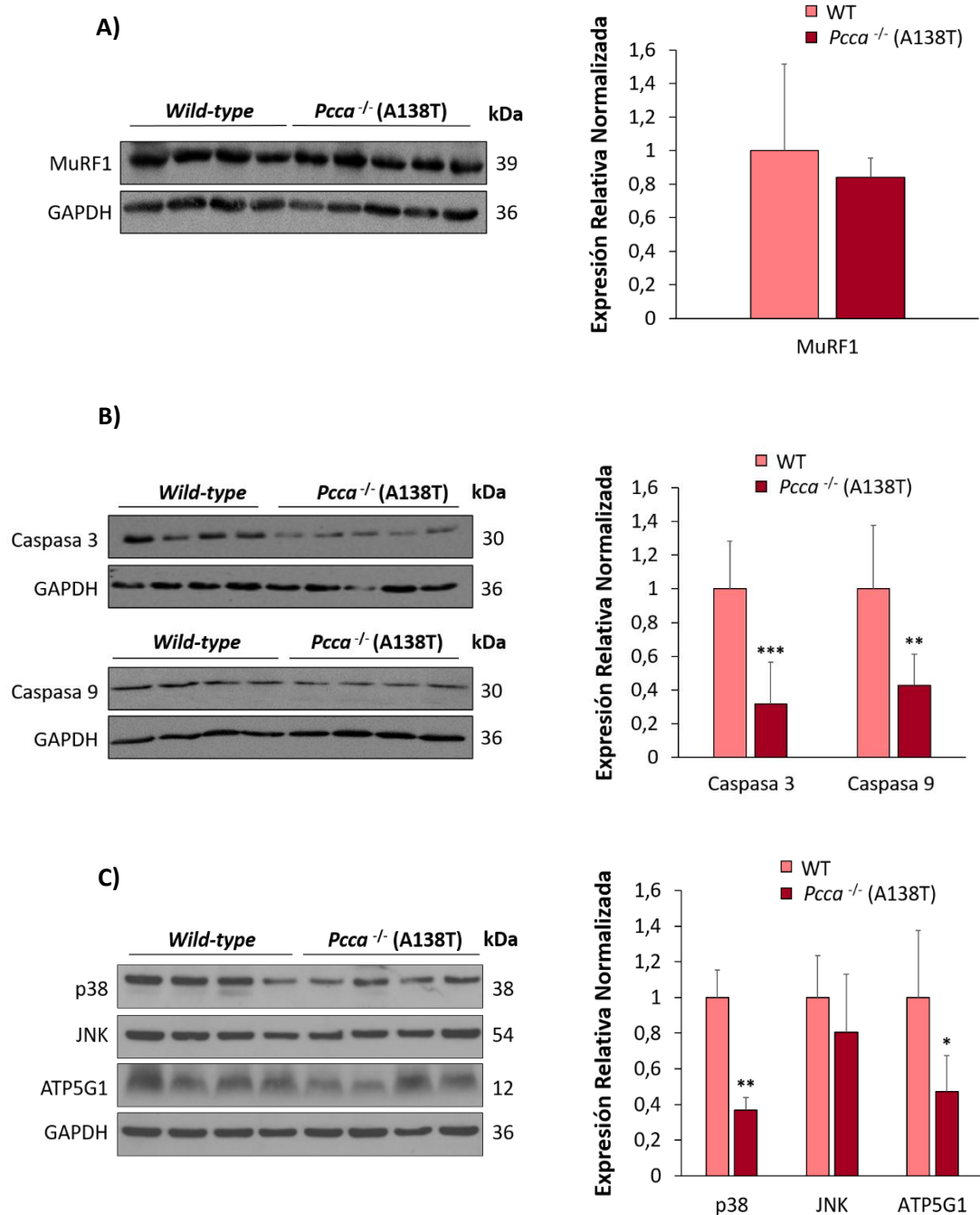


Figura 17. Estudio de las dianas potenciales de los miRNAs miR-23a-3p, miR-133a-3p, miR-338-3p y miR-350-3p. *Western blot* representativo para la detección de las proteínas muRF1 (miR-23a-3p, panel A), caspasa 3 y caspasa 9 (miR-378a-3p y miR-133-3p, panel B), p38 y JNK (miR-350-3p, panel C) y ATP5G1 (miR-338-3p, panel C), en el corazón de los ratones WT (n=4) y *Pcca*^{-/-} (A138T) (n=4/5) a 5 meses de edad. Cada histograma representa los datos en forma de media y desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por la t de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.2. Validación funcional de las dianas del miR-350-3p y miR-338-3p

Una vez detectada la alteración en el patrón de expresión de miRNAs en el corazón del ratón modelo de la enfermedad, se decidió llevar a cabo la realización de ensayos de validación funcional que pudieran aportar una mayor información acerca del papel de los miRNAs en el contexto de la fisiopatología de AP. Estos ensayos de validación funcional de las dianas de miRNAs consisten en la sobreexpresión o inhibición de los miRNAs mediante el empleo de oligonucleótidos conocidos como *mimics* o *antimirs*, respectivamente, para a continuación analizar por WB o qRT-PCR los niveles de las dianas que regulan. Respecto a la elección de los miRNAs para realizar estos estudios, se seleccionaron el miR-350-3p y el miR-338-3p, puesto que, de entre los que presentan un mayor incremento en los niveles de expresión (por encima de 4 veces), son los menos descritos en el contexto de enfermedades cardíacas.

En relación al miR-350-3p y para observar el efecto directo en células cardíacas, se llevó a cabo la transfección tanto con el *mimic* como con el inhibidor del miR-350-3p en la línea celular de cardiomiocitos murinos HL-1. Los resultados de este ensayo muestran como al transfectar con el *mimic* confirmamos por qRT-PCR un incremento en la expresión de este miRNA, y se observa una disminución en la cantidad de proteína de su diana directa p38, mientras que para JNK no se observaba ninguna alteración (**Figura 18A**). Por el contrario, la transfección con el *antimir* no provocaba ningún cambio en la cantidad de proteína de p38 o JNK, si bien sí se detectaba una disminución en la expresión del miR-350-3p (datos no mostrados).

Por otro lado, con respecto al miR-338-3p, el cual tiene una expresión más ubicua y no está tan estrictamente asociado a músculo cardíaco, se llevó a cabo un primer estudio preliminar que mostró una baja expresión de este miRNA en la línea celular HL-1, por lo que para la validación de sus dianas se escogió la línea celular de hepatoma humano (Hep3B) que presentaba una mayor expresión basal de este miRNA. La transfección con el *antimir* dirigido frente al miR-338-3p provocaba una disminución en su expresión, pero sin efectos en la cantidad de proteína ATP5G1 (datos no mostrados), mientras que la sobreexpresión de este miRNA usando su correspondiente miRNA-*mimic* provocaba una disminución en los niveles de ATP5G1 (**Figura 18B**).

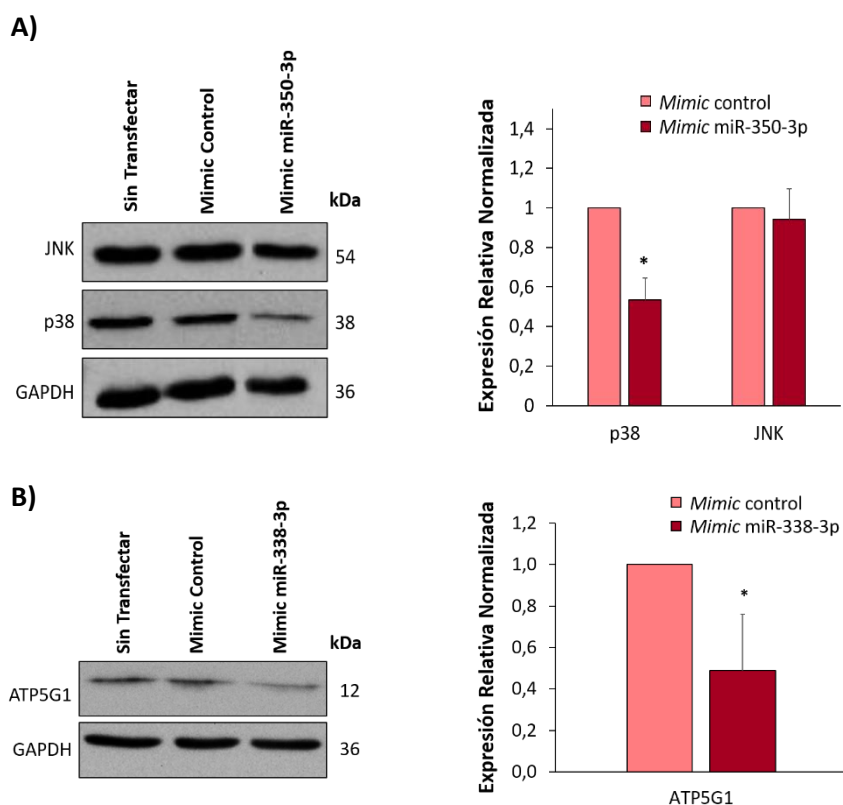


Figura 18. Análisis de validación funcional de las dianas de miR-350-3p y miR-338-3p. Western blots representativos de tres experimentos independientes para la validación de las dianas JNK y p38 para el miR-350-3p en HL-1 (A), y de ATP5G1 en el caso del miR-338-3p, en Hep3B (B). El ensayo se llevó a cabo en tres condiciones diferentes: sin transfectar, transfectadas con el *mimic* control, y transfectadas con el *mimic* del miRNA a testar. Los histogramas representan los datos en forma de media y desviación estándar de la intensidad relativa de cada banda. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por la t de Student: * $p < 0,05$.

2.3. Análisis de miRNAs circulantes en plasma de pacientes AP

El potencial uso de los miRNAs circulantes como biomarcadores, ya demostrado para diferentes patologías (Sheinerman et al., 2017, Wang, G. K. et al., 2010), podría ser también de aplicación para los pacientes con AP, ya que, si bien existen marcadores para el correcto diagnóstico de la enfermedad, no existen buenos marcadores para su seguimiento y prognosis, especialmente en lo referente a la sintomatología cardiaca.

Por esta razón, en este trabajo nos hemos centrado en la caracterización del perfil de expresión de cardiomiRs circulantes en muestras de plasma de un grupo de pacientes de AP mayores de 11 años (Tabla 14) comparados con controles apareados.

En primer lugar, nos planteamos analizar los cardiomiRs que habíamos estudiado previamente en el modelo murino de AP, pero algunos no son detectables en plasma, y en el caso del miR-1a-3p, miR-199b-5p, miR-328a-3p y miR-378a-3p no observamos diferencias entre grupo control y pacientes. Por ello, finalmente nos centramos en el estudio de cuatro miRNAs que presentaban una mayor alteración en su expresión en el modelo murino de la enfermedad: miR-22-3p, miR-29a-3p, miR-133a-3p, y miR-199a-5p, y que podíamos detectar en las muestras de plasma de pacientes. Los resultados muestran que en los pacientes de AP se produce una disminución en los niveles de estos 4 miRNAs en plasma (**Figura 19A**). Al representar los resultados para cada paciente individual se observa como 9 de los 10 pacientes presentan un perfil similar en cuanto a la expresión de estos cardiomiRs (**Figura 19B**), lo que apoya la posible significancia del patrón observado.

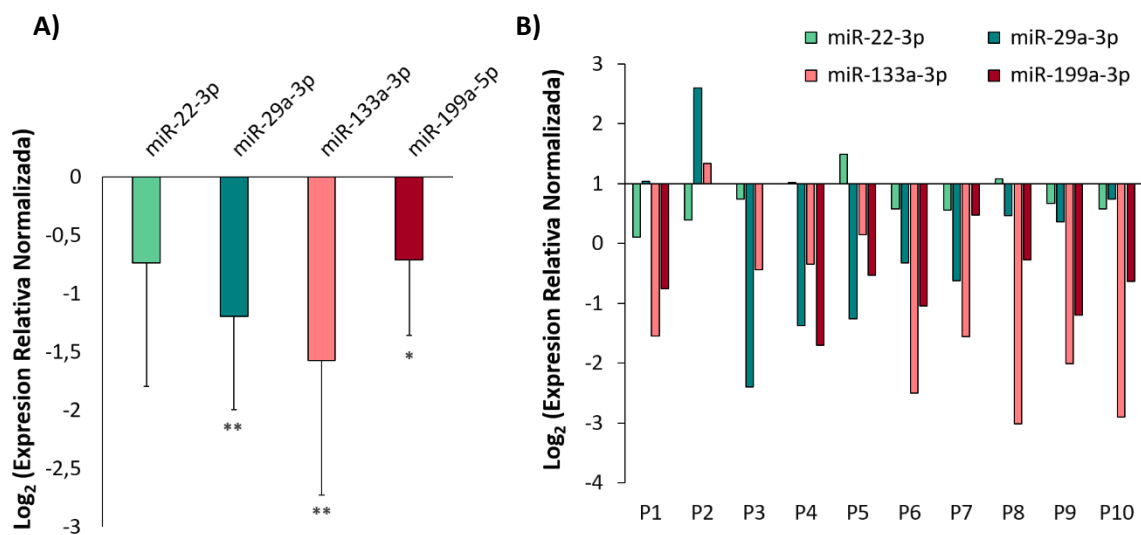


Figura 19. Análisis de expresión de cardiomiRs en plasma de individuos control y pacientes de AP. Los niveles de expresión de los miRNAs miR-22-3p, miR-29a-3p, miR-133a-3p y miR-199a-5p se determinaron por qRT-PCR en muestras plasmáticas de individuos control (n=10) y pacientes de AP (n=10) mayores de 11 años. El panel A muestra la variación en la media y desviación estándar de los 10 pacientes para cada miRNA, mientras que en el panel B se muestra cada uno de los pacientes analizado individualmente. La expresión relativa de cada miRNA se calculó a través del método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ utilizando el miR-103a-3p como control endógeno. La significancia estadística en A se determinó mediante el análisis por la t de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabla 14: Datos bioquímicos, genéticos y del fenotipo cardiaco de los pacientes de AP incluidos en el análisis de miRNAs circulantes

Paciente	Sexo	Edad en el diagnóstico	Plasma (μmol/L)		Orina (mmol/mol creat)			Genotipo	Edad actual	Fenotipo cardiaco	Comentarios
			C3 NV: < 0,89	Gly NV: <293	3OHP NV: <30	PG NV: ND	MC NV: <13				
P1	M	14d Cetoacidosis metabólica hiperamonemia	51	691	955	122	907	PCCB: c.494G>A + c.1218_1231del14ins12	30 años	QT largo a los 14 años	Sin fenotipo cardiaco en el último seguimiento
P2	M	1d Cetosis, hiperamonemia media	59	1072	441	721	681	PCCB: c.1218_1231del14ins12 + c.1218_1231del14ins12	30 años	DCM desde la infancia	Tratado con digoxina
P3	M	1m 22d Cetoacidosis metabólica	23	-	148	33	5909	PCCB: c.502G>A + c.502G>A	21 años	Normal a los 16 años	Sin examinación cardiaca reciente
P4	M	6y 3m Acidosis metabólica	22	-	372	189	907	PCCA: c.1846-2_1852del + c.229C>T	38 años	Normal	-
P5	H	1y 10m Cetoacidosis metabólica	31,3	-	72	4	364	PCCB: c.502G>A + c.1173dupT	23 años	DCM emergente	DCM recién detectada
P6	H	3y 1m Cetoacidosis metabólica	25	1010	514	756	1295	PCCB: c.502G>A + c.1218_1231del14ins12	17 años	QT largo	Sin impacto clínico
P7	H	2m 2d Acidosis metabólica	40	922	204	13	724	PCCB: c.737G>A + c.737G>A	20 años	Normal	-
P8	M	11y 5d Cetosis, varicela.	23	-	184	10	220	PCCB: c.683C>T + c.1218_1231del14ins12	14 años	QT largo	Gemelo de P10
P9	M	25y 5m. Sin alteraciones metabólicas	8	-	125	14	178	PCCB: c.683C>T + c.1218_1231del14ins12	28 años	QT largo	Hermana de P8 y P10
P10	H	11y 7m Sin alteraciones metabólicas	11	-	94	11	329	PCCB: c.683C>T + c.1218_1231del14ins12	14 años	QT largo	Gemelo de P8

Pie de tabla. Las abreviaturas C3, 3OHP, PG y MC se corresponden con los términos propionato, 3-hidroxipropionato, propionilglicina y metilcitrato, respectivamente. Los términos d, m, e y hacen referencia a los días, meses y años respectivamente.

3. Análisis del efecto del propionato en cardiomiocitos HL-1

Los resultados obtenidos en el apartado anterior muestran que, en AP, al igual que en otras enfermedades, puede existir una desregulación de miRNAs que contribuya al desarrollo de la patología. No obstante, aunque se conoce la causa genética responsable de AP, no hay evidencias claras acerca de qué mecanismos o factores podrían provocar esta desregulación de miRNAs en el contexto del desarrollo de la sintomatología cardiaca. Sin embargo, cabe destacar que la expresión de miRNAs puede estar regulada tanto a nivel transcripcional como a nivel post-transcripcional, a través de diversos agentes endógenos, como hormonas o citoquinas, o exógenos como los xenobióticos, que ejercen efectos directos o indirectos en el control de su expresión (Gulyaeva, Kushlinskiy, 2016).

Por ello, en este trabajo hemos postulado el papel central del propionato como metabolito tóxico que se acumula en AP y como factor que puede desencadenar la desregulación en la expresión de cardiomiRs y contribuir junto con la generación de ROS al desarrollo de la fisiopatología cardiaca en AP. Para ello, hemos empleado un sistema de ensayo *in vitro* sobre la línea celular de cardiomiocitos murinos HL-1, incubando las células con propionato a una concentración de 5 mM, niveles hallados en plasma de pacientes de AP (Feliz, Witt & Harris, 2003). El efecto sobre la generación de ROS se analizó mediante citometría de flujo empleando la sonda H₂DCFDA, mientras que el efecto patológico sobre el cardiomiocito se cuantificó analizando la expresión de los marcadores de daño cardiaco y de cardiomiRs. Finalmente, se realizaron estudios de microscopía confocal para analizar el efecto sobre el citoesqueleto de actina que pudiera indicar un proceso de remodelado celular que acompaña al desarrollo de la patología cardiaca.

3.1. Análisis de los niveles intracelulares de ROS

Estudios previos en el laboratorio demuestran que en fibroblastos obtenidos de pacientes de AP se observa un incremento en la producción intracelular de ROS (Gallego-Villar et al., 2014). Para mimetizar las condiciones fisiológicas presentes en las células de pacientes de AP, los cardiomiocitos HL-1 se cultivaron en presencia de propionato a 5 mM durante 4 días. A continuación, las células se incubaron con la sonda H₂DCFDA, capaz de detectar la presencia de grupos hidroxilo, peroxilo, el anión superóxido y otras formas de ROS. Los resultados muestran un incremento de 2,5 veces (Figura 20) en la intensidad de fluorescencia de la sonda H₂DCFDA, lo que estaría en concordancia con los datos obtenidos de fibroblastos de pacientes.

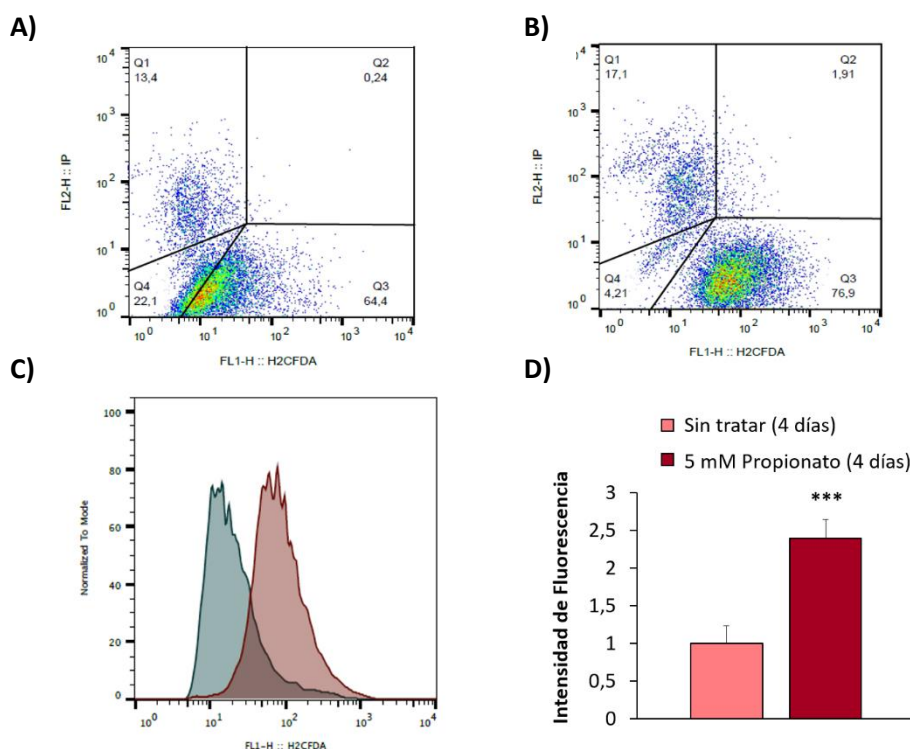


Figura 20. Análisis de la generación de ROS inducida por propionato mediante citometría de flujo. Representación de la distribución de las poblaciones celulares sin tratar (A) y tratadas con propionato (B) en relación a la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda H₂DCFDA. El panel C muestra en forma de histograma la distribución de las poblaciones sin tratar (en verde) y tratadas con propionato (en rojo) según la fluorescencia emitida. Representación gráfica de la medición de ROS en seis experimentos independientes (D) en células sin tratar y tratadas con propionato, mostrando los datos en forma de media y desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por la t de Student: *** $p < 0,001$.

3.2. Análisis de expresión de marcadores de daño cardiaco y cardiomiRs

Una vez detectado el incremento en la producción de ROS tras el tratamiento con propionato, el siguiente objetivo se centró en testar el posible desarrollo de daño en el cardiomiocito. Para ello, tras cultivar las células HL-1 durante 4 días con propionato a concentración 5 mM, se analizaron los niveles de expresión de los genes codificantes para los marcadores de daño cardiaco ANP, BNP y β -MHC (*Nppa*, *Nppb* y *Myh7*, respectivamente). En correlación con los resultados obtenidos en el modelo murino de AP (apartado 1.2. [Figura 9](#)), en las células tratadas con propionato se observa un incremento estadísticamente significativo de la expresión de los genes codificantes para los marcadores de daño cardiaco BNP y β -MHC ([Figura 21A](#)).

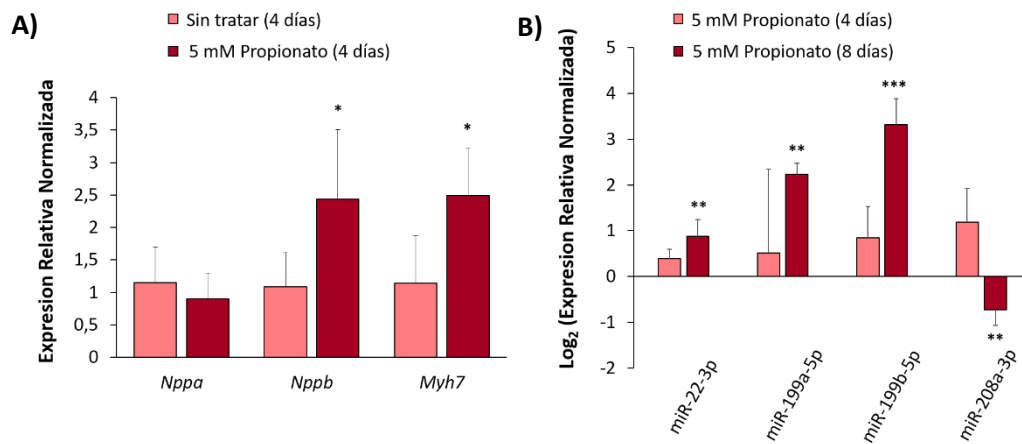


Figura 21. Efecto del propionato sobre la expresión de marcadores de daño cardiaco y de cardiomiRs. El análisis de expresión de los genes marcadores de daño cardiaco (A) y cardiomiRs (B) se llevó a cabo mediante qRT-PCR en células HL-1 sin tratar o cultivadas a una concentración 5 mM de propionato. La expresión relativa en ambos casos fue calculada utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando el gen *Gapdh* como control de expresión constitutiva en el análisis de los marcadores de daño cardiaco, mientras que para los cardiomiRs se utilizaron el snRNA U6 y el miR-423 como controles endógenos. Los histogramas representan los datos en forma de media y desviación estándar de seis experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por la t de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Finalmente, procedimos a estudiar el patrón de expresión de los cardiomiRs en los cardiomiocitos tratados o no con propionato. Para este análisis se seleccionaron los 4 miRNAs que presentaban una expresión mayoritaria en el corazón del modelo murino de AP: miR-22-3p, miR-199a-5p, miR-199b-5p y miR-208a-3p (Figura 14 del apartado 2.1.1). El tratamiento con propionato durante 4 días no resultó en cambios significativos en la expresión de estos miRNAs, por lo que se aumentó el tiempo de tratamiento a 8 días, tras los cuales se observó una desregulación significativa de la expresión relativa de estos 4 miRNAs (Figura 21B).

3.3. Análisis de reorganización del citoesqueleto de actina

Ante un estímulo patológico, en el corazón se produce la activación de mecanismos adaptativos que permiten responder de forma adecuada ante este estímulo. No obstante, de persistir estas señales, estos cambios adaptativos pueden establecerse de forma permanente en el corazón, contribuyendo al desarrollo de cardiomiopatías. Una de las primeras respuestas adaptativas implica la reorganización de las proteínas que conforman los sarcómeros para intentar mejorar la capacidad contráctil del corazón (Heineke, Molkentin, 2006).

Por esto, nos planteamos analizar en los cardiomiocitos HL-1 tratados con propionato la organización del citoesqueleto de actina, uno de los principales constituyentes de los sarcómeros. Para ello, se trataron las células con propionato a concentración 5 mM durante 4 días y se fijaron con formalina al 10%. A continuación, se incubaron con la sonda fluorescente *Actin Green* que marca la actina filamentosa. Los primeros resultados mostraban una ligera diferencia en la organización del citoesqueleto de actina (Figura 22). No obstante, para comprobar que, al igual que en el caso de los miRNAs, pudiera existir una mayor organización del citoesqueleto de actina como consecuencia de un daño prolongado, las células se incubaron con propionato durante 8 días. Tras analizar las células por microscopía confocal, se observó una tendencia a la organización del citoesqueleto de actina como una red de fibras ordenadas en aquellas células tratadas con propionato (Figura 22).

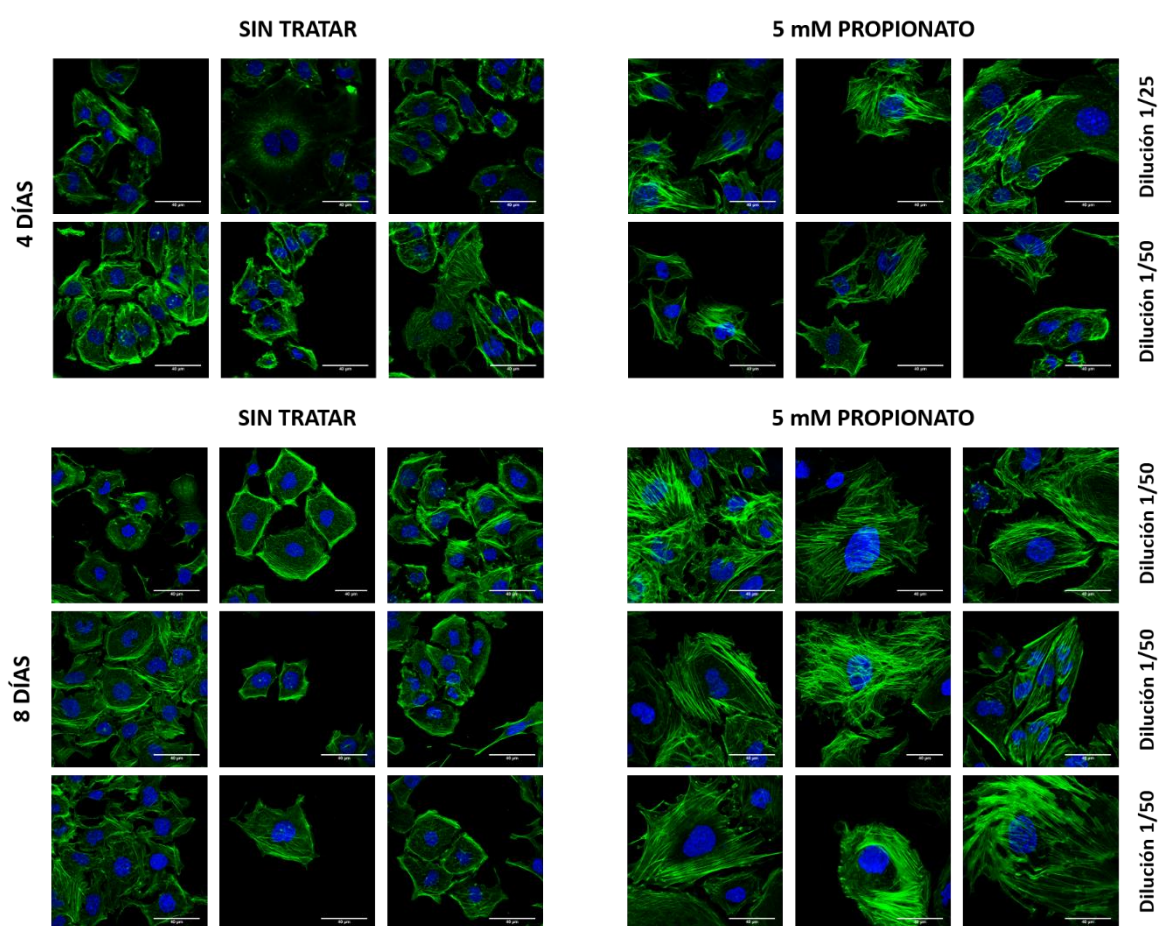


Figura 22. Análisis de la organización del citoesqueleto de actina. El patrón de organización del citoesqueleto de actina se analizó por microscopía confocal en células HL-1 sin tratar y tratadas con 5 mM de propionato durante 4 u 8 días mediante su posterior fijación e incubación con la sonda fluorescente *Actin Green*, a dilución 1/25 o 1/50. Se representan varias imágenes obtenidas en campos aleatorios por cada condición y tiempo, referidas a 3 experimentos independientes.

4. Nuevas aproximaciones terapéuticas en el modelo murino de AP

Como se ha mencionado en la introducción, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que, en combinación con los tratamientos tradicionales, proporcionen una respuesta más eficaz frente a la AP. En los últimos años y dada la implicación de los miRNAs en distintas patologías, ha cobrado especial interés la modulación de los niveles de estos RNAs mediante el empleo de *mimics* o inhibidores, mostrando su eficacia terapéutica en distintas patologías (Care et al., 2007, Montgomery et al., 2014). Por ello, una vez identificada la sobreexpresión e implicación de miRNAs en la fisiopatología cardiaca de AP, nos hemos centrado en la reducción de los niveles de expresión del miR-208a-3p para evaluar su efecto sobre el desarrollo de las alteraciones cardiacas.

Por otro lado, estudios previos en el laboratorio han mostrado la eficacia del tratamiento con antioxidantes como el mitoQ y el resveratrol para disminuir el daño oxidativo en tejidos relevantes para la enfermedad, así como para reducir o prevenir del daño cardiaco en el modelo murino de AP (Rivera-Barahona et al., 2017). Para complementar estos resultados, se decidió analizar en el corazón del ratón AP el efecto terapéutico del bezafibrato, agonista del eje PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*), como potenciador de la biogénesis mitocondrial.

4.1. Tratamiento con oligonucleótidos antisentido contra el miR-208a-3p

En este trabajo hemos utilizado un *antimiR* dirigido contra el miR-208a-3p, dado que se ha demostrado que una inhibición de este miRNA es capaz de prevenir eficazmente el remodelado cardiaco en un modelo de FC en ratas Dahl, abriendo su uso potencial como agente terapéutico (Montgomery et al., 2011). Para ello, en un estudio preliminar, ratones AP machos de 4 meses de edad se sometieron a tres inyecciones consecutivas con el *antimiR*-208a-3p (n=5) o con el *antimiR* control (n=4), en ambos casos a una concentración de 20 mg/kg cada día, siguiendo las pautas de tratamiento descritas en otros estudios (Bernardo et al., 2016, Montgomery et al., 2011). Cinco semanas después, se monitorizaron los niveles de expresión en corazón del miR-208a-3p y el miR-499a-5p, ambos pertenecientes a la misma familia, debido a que la expresión del miR-499a-5p está regulada por el miR-208a-3p (van Rooij et al., 2009). Los resultados obtenidos no reflejaron una disminución significativa en los niveles de estos miRNAs en los ratones AP tratados con el *antimiR*-208a-3p en comparación con los ratones sin tratar (**Figura 23A**).

Asimismo, el estudio de la expresión de los marcadores de daño cardíaco *Myh7* y *Nppb* no mostró la reducción de los mismos en los ratones tratados con el *antimiR-208a-3p* (Figura 23B).

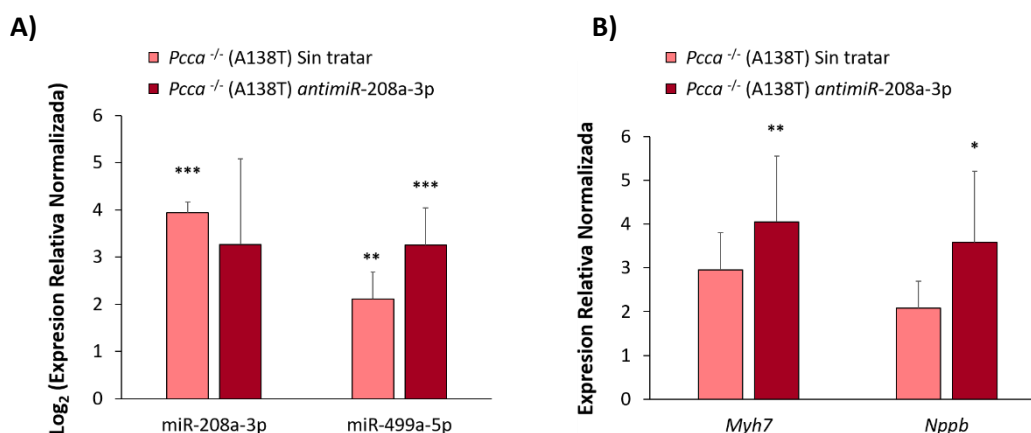


Figura 23. Análisis de expresión de marcadores de daño cardíaco y cardiomiRs en ratones tratados con el *antimiR-208a-3p*. La expresión de los cardiomiRs (A) y genes marcadores de daño cardíaco (B) se analizó mediante qRT-PCR en el corazón de los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) sin tratar (n=5) y tratados con el *antimiR-208a-3p* (n=5), en comparación con los ratones WT (n=5). La expresión relativa en ambos casos fue calculada utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando el snRNA U6 y el miR-423-3p como controles endógenos en el análisis de expresión de cardiomiRs, mientras que en el análisis de los marcadores de daño cardíaco se utilizó el gen *Gapdh* como control de expresión constitutiva. Los histogramas representan los datos en forma de media y desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por ANOVA seguido de las pruebas *Tukey's* HD o *Games Howell post hoc test*, según correspondiera: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Igualmente, los datos del estudio de la fisiología y función cardíaca por ecocardiograma previos al sacrificio de los ratones no mostraron signos de mejoría de las alteraciones cardíacas que desarrolla el modelo murino. De forma semejante a los resultados mostrados en el apartado 1.1., los ratones AP muestran incrementos significativos en los parámetros IVSd y LVPWd, ambos asociados con remodelado cardíaco, aunque no se observan diferencias en la masa del corazón (Tabla 15). De igual manera, el tratamiento con *antimiR-208a-3p* no impide que se produzca un incremento en el diámetro interno del ventrículo izquierdo (Figura 24A), en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T).

Tabla 15: Ecocardiograma de ratones incluidos en el estudio con el *antimiR-208a-3p*

Condición	Edad	IVSd/Peso	LVPW/Peso	Masa VL/Peso	LV Vol (s)	LV Vol (d)
WT sin tratar	5 meses	0,022 ± 0,0015	0,022 ± 0,0007	3,06 ± 0,34	29,82 ± 5,30	82,29 ± 9,52
<i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) sin tratar	5 meses	0,025 ± 0,0038	0,025 ± 0,0028	3,09 ± 0,31	25,89 ± 4,92	70,58 ± 5,21
<i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) Control	5 meses	0,026 ± 0,0026	0,027 ± 0,0022 (*)	2,92 ± 0,03	19,64 ± 4,04	66,77 ± 4,35 (*)
<i>Pcca</i> ^{-/-} (A138T) <i>antimiR-208a-3p</i>	5 meses	0,029 ± 0,0033 (**) (#)	0,03 ± 0,0027 (***) (#)	2,98 ± 0,61	17,61 ± 5,51	57,24 ± 12,01 (***) (##) (\$)

Pie de tabla. Los símbolos * hacen referencia a la comparación con la condición WT; los símbolos # al comparar con *Pcca*^{-/-} (A138T) sin tratar; y el símbolo \$, al comparar con *Pcca*^{-/-} (A138T) *antimiR*-control. */#/\$ $p < 0,05$; **/##/\$\$ $p < 0,01$; ***/###/\$\$\$ $p < 0,001$.

Asimismo, el tratamiento con el *antimiR-208a-3p* tampoco ejerce ningún efecto sobre la función cardíaca en los ratones AP. Esto se observa en la **figura 24B-D**, donde se muestra como los ratones AP tratados con el *antimiR*-control y el *antimiR-208a-3p* presentan unos valores similares en parámetros referentes a la función sistólica (FE y FS) y diastólica (cociente E/A).

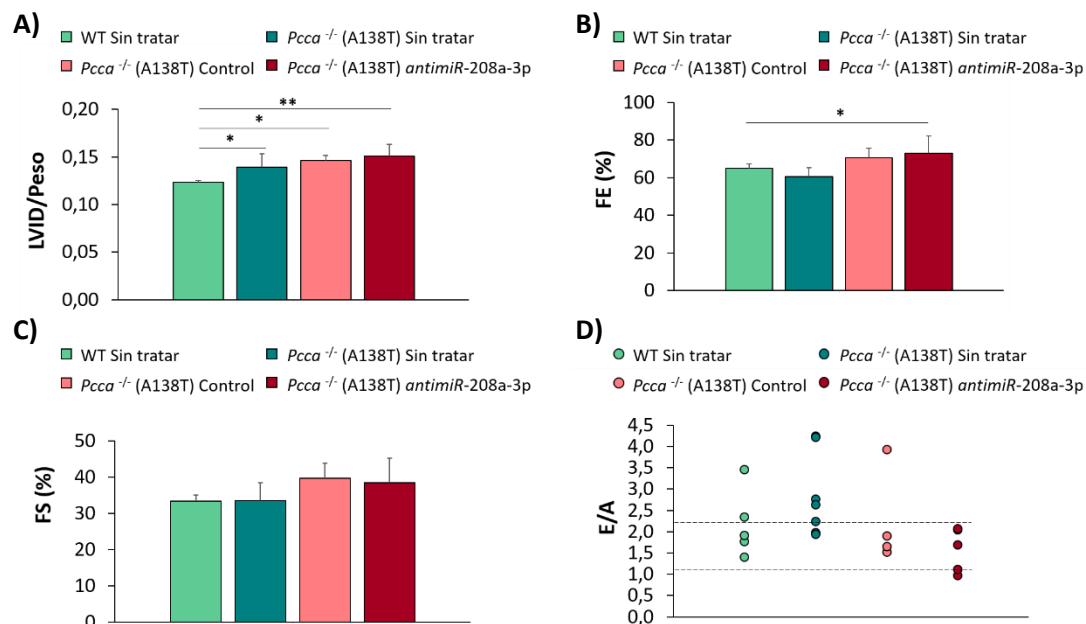


Figura 24. Análisis de la función cardíaca por ecocardiograma longitudinal de modo M en ratones AP incluidos en el estudio con el *antimiR-208a-3p*. (Leyenda de figura en la página siguiente).

(Página anterior)

Figura 24. Análisis de la función cardíaca por ecocardiograma longitudinal de modo M en ratones AP incluidos en el estudio con el *antimiR-208a-3p*. Las medidas del (A) diámetro interno del ventrículo izquierdo (LVID), (B) fracción de eyección (FE), (C) fracción de acortamiento (FS) y (D) función diastólica (E/A) se analizaron en ratones AP sin tratar (n=7) o tratados con el *antimiR* control (n=4) o el *antimiR-208a-3p* (n=5) a dosis 20 mg/kg*día, en comparación con ratones WT (n=6) a 5 meses de edad. El parámetro LVID fue normalizado con respecto al peso de cada ratón. Los histogramas recogen los datos en forma de media y desviación estándar, mientras que el diagrama de dispersión para E/A muestra cada ratón individualizado. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por ANOVA seguido de *Tukey's* HD o *Games Howell post hoc test*, según correspondiera: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2. Tratamiento con bezafibrato

El déficit energético como consecuencia de la disfunción mitocondrial secundaria es uno de los principales mecanismos fisiopatológicos en AP, lo que causa importantes alteraciones en tejidos con una alta demanda energética como el corazón o el cerebro. Por esta razón, la activación farmacológica de la biogénesis y función mitocondrial podría tener efectos beneficiosos en estos órganos. Con este propósito se decidió investigar el efecto del fármaco bezafibrato, agonista de los receptores activadores por proliferadores peroxisomales o PPAR, en el corazón del modelo murino de AP. Para ello, ratones WT y *Pcca*^{-/-} (A138T) de 5 meses de edad de ambos sexos se dividieron de forma aleatoria en grupos de ratones (n=7/8 por grupo) tratados o sin tratar con bezafibrato. Los ratones se mantuvieron en tratamiento durante 4 meses a una dosis de 0,5mg/kg y día, para a continuación analizar por qRT-PCR los efectos sobre la biogénesis mitocondrial y la expresión de marcadores de daño cardíaco y de cardiomiRs. Finalmente, se llevó a cabo un análisis mediante un *array* de proteína en fase reversa RPPma (*Reverse Phase Protein microarray*, ProteomAb) (Santacatterina et al., 2018) que permitió examinar el perfil energético y de las defensas antioxidantes.

4.2.1. Estudio de biogénesis mitocondrial

El efecto del tratamiento con bezafibrato sobre la biogénesis mitocondrial se analizó mediante la cuantificación por qRT-PCR de la expresión de genes implicados en la regulación del metabolismo energético mitocondrial, así como de la replicación y transcripción del mtDNA. Los resultados obtenidos reflejan cómo tras el tratamiento con bezafibrato se produce un incremento estadísticamente significativo en los niveles de los genes *Ppara*, *Ppard*, *Esrra* y *Nrf1* implicados en el metabolismo de ácidos grasos, glucosa, fosforilación oxidativa y replicación y transcripción del mtDNA (**Figura 25**). Sin embargo, se observa también una disminución en la expresión del gen *Ppargc1a*, uno de los reguladores principales de la vía.

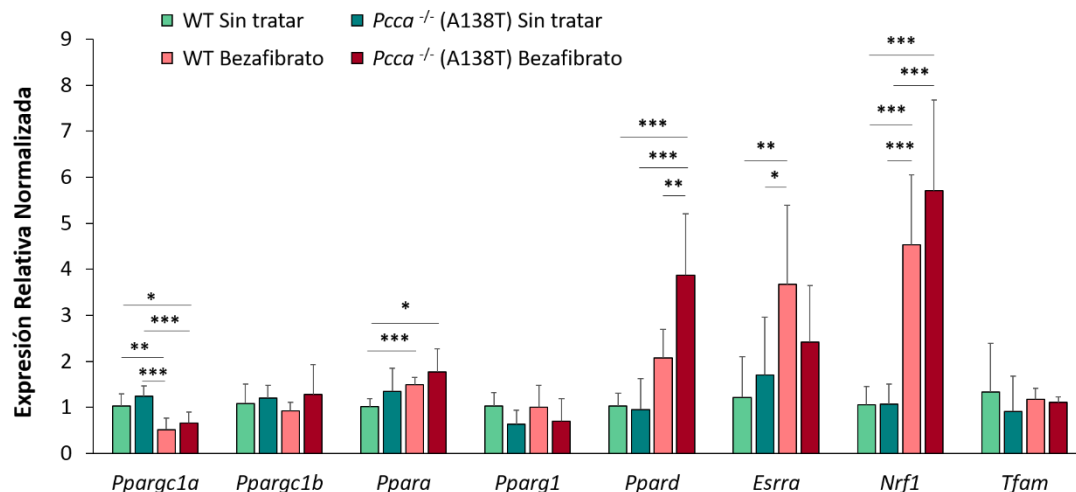


Figura 25. Efecto del bezafibrato en la expresión de genes marcadores de biogénesis mitocondrial en el tejido cardiaco del ratón AP. Se analizó la expresión de los genes indicados por qRT-PCR en el corazón de los ratones WT y *Pcca*^{-/-} (A138T) tratados con dieta control (n=7, n=8, respectivamente) o suplementada con bezafibrato (n=8 en ambas condiciones). La expresión relativa fue calculada utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando el gen *Gapdh* como control de expresión constitutiva. Los histogramas representan los datos en forma de media y desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por ANOVA seguido de las pruebas *Tukey's* HD o *Games Howell post hoc test*, según correspondiera: **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001.

4.2.2. Estudio de expresión de cardiomiRs

Con respecto al estudio de los miRNAs, el objetivo se centró en determinar si la desregulación en la expresión de los cardiomiRs observada previamente continuaba presente en el ratón AP a 9 meses de edad, y, en el caso de existir, si el tratamiento con bezafibrato tenía algún efecto en la desregulación de estos miRNAs. Para este análisis se seleccionaron los 4 cardiomiRs que presentaban un mayor incremento en la expresión en el corazón del modelo murino de AP. Los resultados obtenidos reflejan que a esta edad existen ligeras diferencias que no llegan a ser significativas en la expresión del miR-22-3p y miR-208a-3p entre las condiciones WT y *Pcca*^{-/-} (A138T), y por tanto tampoco se observan diferencias tras el tratamiento con bezafibrato. Sin embargo, con respecto al miR-199a-5p, miRNA estrechamente ligado con el metabolismo energético, se observa un descenso significativo de su expresión tras el tratamiento con este compuesto (Figura 26).

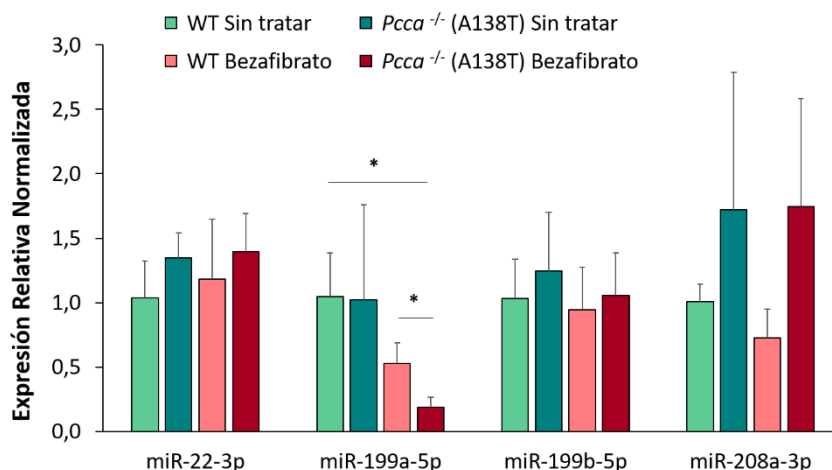


Figura 26. Efecto del tratamiento con bezafibrato en la expresión de cardiomiRs en el modelo murino de AP. Los niveles de expresión de los cardiomiRs miR-22-3p, miR-199a/b-5p y miR-208a-3p se analizaron por qRT-PCR en el corazón de los ratones WT y *Pcca*^{-/-} (A138T) tratados con dieta control (n=7, n=8, respectivamente) o suplementada con bezafibrato (n=8 en ambas condiciones). La expresión relativa de cada miRNA se calculó empleando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el snRNA U6 y el miR-423-3p como controles de expresión constitutiva. Los datos se representan como la media y la desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por ANOVA seguido de las pruebas *Tukey's* HD o *Games Howell post hoc test*, según correspondiera: * $p < 0,05$.

4.2.3. Microarray de proteína en fase reversa (RPPma)

Las diferencias existentes en el perfil de proteínas en tejido cardiaco entre los ratones WT y AP, así como los efectos provocados por el tratamiento con bezafibrato, se analizaron mediante un estudio por RPPma llevado a cabo en el laboratorio del Profesor José M. Cuezva (CBMSO, Madrid, España). Se analizaron proteínas implicadas en la integridad y dinámica mitocondrial (MFN2), en procesos del metabolismo y obtención de energía como la glicolisis (GAPDH y ENO1), metabolismo de ácidos grasos (HADHA, ETFA, CPT1, y GPD1), fosforilación oxidativa (IF1, β F1 y NADH9), la ruta de las pentosas fosfato (G6PDH), y finalmente, las defensas antioxidantes (SOD1, SOD2, PRX6, PRX3 y TXN). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 27**.

Con respecto a la dinámica mitocondrial, se analizaron los niveles de la mitofusina 2 (MFN2), proteína implicada en la fusión mitocondrial, observando un incremento en la expresión de esta proteína en los ratones AP, el cual es corregido al tratar con bezafibrato, recuperando valores similares a los del WT.

En relación a la glicolisis, se estudiaron las proteínas gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y enolasa 1 (ENO1), observando una tendencia a la sobreexpresión en el modelo murino de AP, aunque no llega a alcanzar significancia estadística. Sin embargo, al tratar con bezafibrato,

tanto en la condición WT como en los ratones *Pcca*^{-/-} (A138T) se observa una tendencia a la disminución en la cantidad de estas proteínas.

Con respecto a las proteínas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos, se detectó un incremento significativo de los niveles de la enzima trifuncional mitocondrial (HADHA) en el corazón del ratón AP, que no se corrige tras el tratamiento con bezafibrato. No obstante, en el caso de las proteínas ETFA (flavoproteína transportadora de electrones) y GPD1 (glicerol fosfato deshidrogenasa 1) tras el tratamiento con bezafibrato se recuperan unos valores similares a los del WT.

Por su parte, el estudio sobre la fosforilación oxidativa reveló un incremento de la proteína inhibidora de la ATPasa (IF1), sin producirse ningún cambio tras el tratamiento con bezafibrato. Por el contrario, el nivel del complejo III de la CTE (CORE2) aumentó al tratar con bezafibrato, especialmente en el caso del ratón AP.

Finalmente, en el estudio de las defensas antioxidantes se analizaron las variantes citosólicas y mitocondriales de las proteínas superóxido dismutasa (SOD1 y SOD2, respectivamente) y peroxirredoxina (PRX6 y PRX3, respectivamente), así como la tioxirredoxina (TXN). En todas ellas excepto SOD1 se observa un incremento de sus niveles en el ratón AP en condiciones basales (dieta control), que se corrige tras el tratamiento con bezafibrato en el caso de la tioxirredoxina.

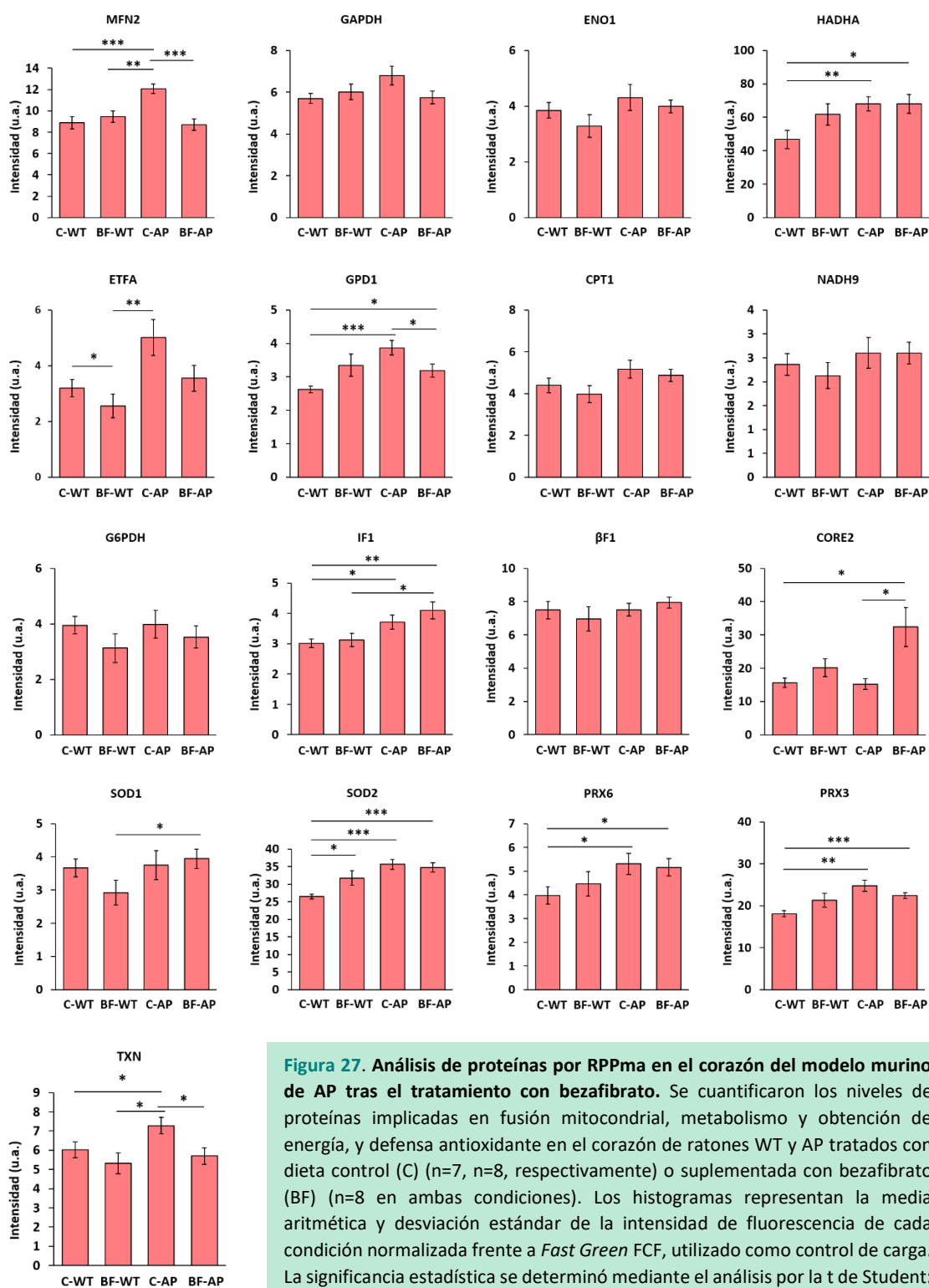


Figura 27. Análisis de proteínas por RPPma en el corazón del modelo murino de AP tras el tratamiento con bezafibrato. Se cuantificaron los niveles de proteínas implicadas en fusión mitocondrial, metabolismo y obtención de energía, y defensa antioxidante en el corazón de ratones WT y AP tratados con dieta control (C) (n=7, n=8, respectivamente) o suplementada con bezafibrato (BF) (n=8 en ambas condiciones). Los histogramas representan la media aritmética y desviación estándar de la intensidad de fluorescencia de cada condición normalizada frente a *Fast Green FCF*, utilizado como control de carga. La significancia estadística se determinó mediante el análisis por la t de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5. Generación y caracterización de un modelo control isogénico a partir de iPSCs de un paciente de AP mediante edición génica con CRISPR-Cas9

Actualmente, las iPSC constituyen una herramienta que permite modelizar diferentes enfermedades. Además, gracias a su capacidad de pluripotencia, son capaces de diferenciarse a cualquier tipo celular, lo que facilita no solo los estudios fisiopatológicos, sino que también abre la posibilidad de testar nuevos fármacos o el desarrollo de terapias celulares. No obstante, debido a la variedad entre individuos, es necesario el desarrollo de los denominados controles isogénicos, los cuales se generan a partir de una línea ya establecida, por lo que mantienen el fondo genético y permiten valorar que las diferencias observadas son consecuencia directa de la presencia de una variante patogénica. Por ello, en este trabajo hemos generado y caracterizado un control isogénico obtenido a partir de una línea de iPSC de un paciente con defectos en el gen *PCCB* previamente generada y caracterizada en el laboratorio (López-Márquez et al., 2019).

5.1. Edición génica de la línea de iPSC mediante el sistema CRISPR-Cas9

La generación de la línea de iPSC *PCCB* WT-isogénico se llevó a cabo mediante recombinación homóloga utilizando un oligonucleótido de DNA de cadena sencilla (ssDNA) (Tabla 4), para reemplazar la secuencia mutante de 12 nucleótidos por la región WT de 14. Para ello, se diseñaron guías específicas (Tabla 4) dirigidas contra la región de la mutación (Figura 28). Los resultados obtenidos del análisis de fragmentos tras el corte con enzimas de restricción y secuenciación por el método de Sanger mostraron en un primer experimento que la edición se había producido en heterocigosis (datos no mostrados) y únicamente en colonias obtenidas utilizando el crRNA2. Por lo tanto, se diseñó una nueva guía específica (crRNA3, Tabla 4) y se llevó a cabo un segundo proceso de edición sobre una de las colonias heterocigotas. En este caso, se analizó el porcentaje de edición mediante la técnica ddPCR, en la que se mostraba que el alelo corregido estaba presente en aproximadamente un 60% (Figura 28). La confirmación de la edición se realizó en las colonias aisladas mediante el estudio de fragmentos tras la digestión con enzimas de restricción y secuenciación de Sanger (Figura 28). En la colonia seleccionada correctamente editada no se detectaron mutaciones en 4 sitios *off-target* localizados en regiones génicas para estas guías según predicciones bioinformáticas (datos no mostrados).

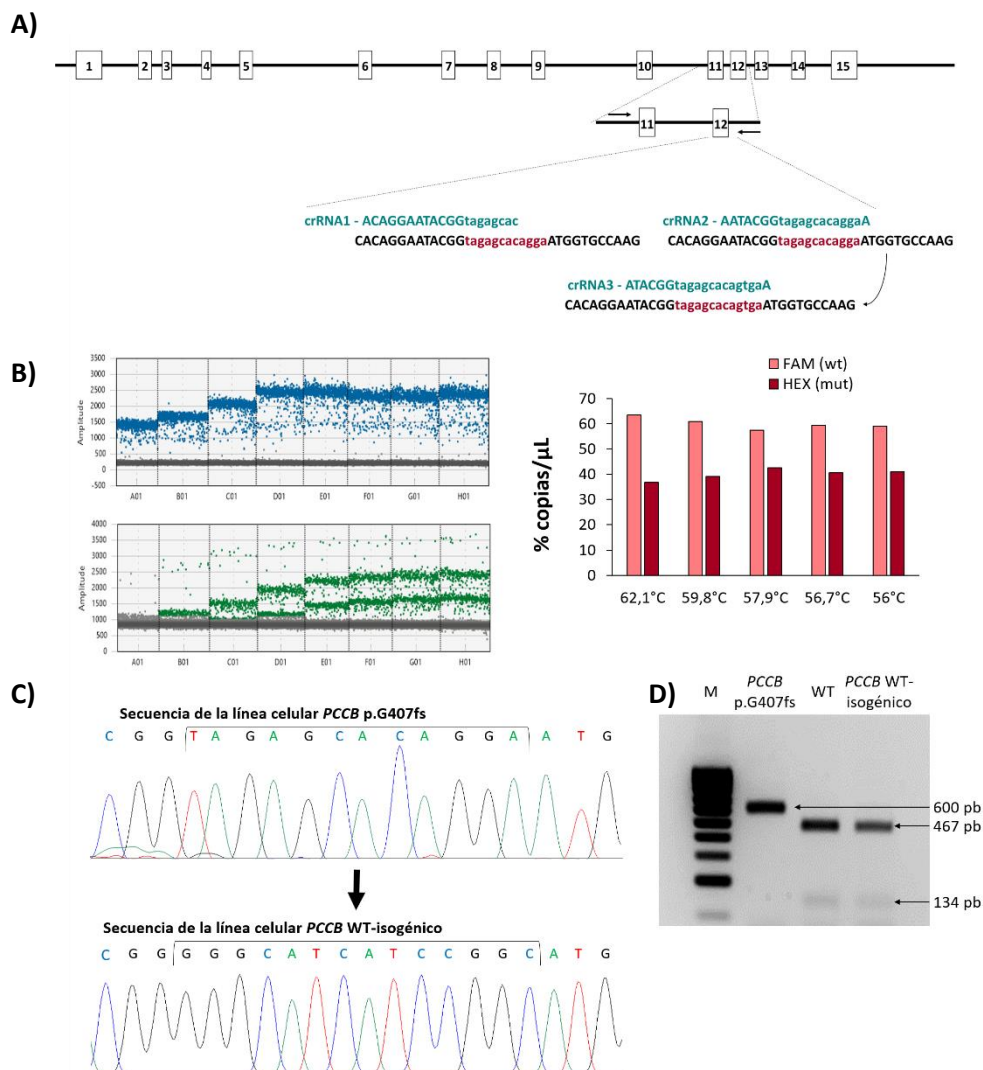


Figura 28. Generación de la línea celular de iPS *PCCB* WT-isogénico. (A) Representación esquemática de la región de la mutación en el gen *PCCB* y las guías del sistema CRISPR-Cas9 utilizadas en el ensayo. (B) Análisis por ddPCR del porcentaje del alelo WT tras el proceso de edición génica. Se representan las distribuciones de gotas positivas para las sondas FAM (WT) en azul y HEX (mutante) en verde, así como los porcentajes relativos de cada sonda a las distintas temperaturas en que se realizó el ensayo. (C) Secuenciación por el método de Sanger de la línea de partida y la línea *PCCB* WT-isogénico tras el proceso de edición. (D) Análisis de edición mediante fragmentos de DNA tras la digestión con *MspI* que muestra la recuperación del sitio de corte para dicha enzima.

5.2. Caracterización de la línea isogénica de iPS generada

Una vez comprobada la corrección de la mutación mediante el sistema CRISPR-Cas9, el siguiente paso se centró en comprobar que, durante el proceso de edición, no se había producido ninguna alteración genómica o cromosómica en la línea celular, y que además mantenía las características propias de pluripotencia. La línea *PCCB* WT-isogénico presentaba la morfología típica de las células madre embrionarias (**Figura 29D**). Los estudios realizados por inmunofluorescencia y citometría de flujo permitieron detectar la presencia de proteínas necesarias para el mantenimiento de la

puripotencia, como los factores de transcripción OCT3/4, NANOG y SOX2 (**Figura 29A**), o los marcadores de superficie SSEA3, SSEA4, Tra1-60 y Tra1-81 (**Figuras 29A y 29B**). Finalmente, la generación de los cuerpos embrionarios y su posterior diferenciación a las 3 capas embrionarias, confirmada a través de la detección de marcadores específicos para ectodermo, endodermo y mesodermo (**Figura 29C**), determinaron la capacidad de diferenciación *in vitro* de la línea isogénica generada. Por otra parte, realizamos un análisis del cariotipo celular (46 XX) (**Figura 29E**), analizando más de 20 metafases que reflejaban que no se había producido ningún reordenamiento cromosómico como consecuencia del proceso de edición génica o bien del mantenimiento del propio cultivo. Asimismo, el análisis de la huella genética mediante el estudio de microsatélites confirmó que la nueva línea generada conserva los mismos alelos que los detectados anteriormente en los fibroblastos y en la línea de iPSC original (datos confidenciales no mostrados) (López-Márquez et al., 2019).

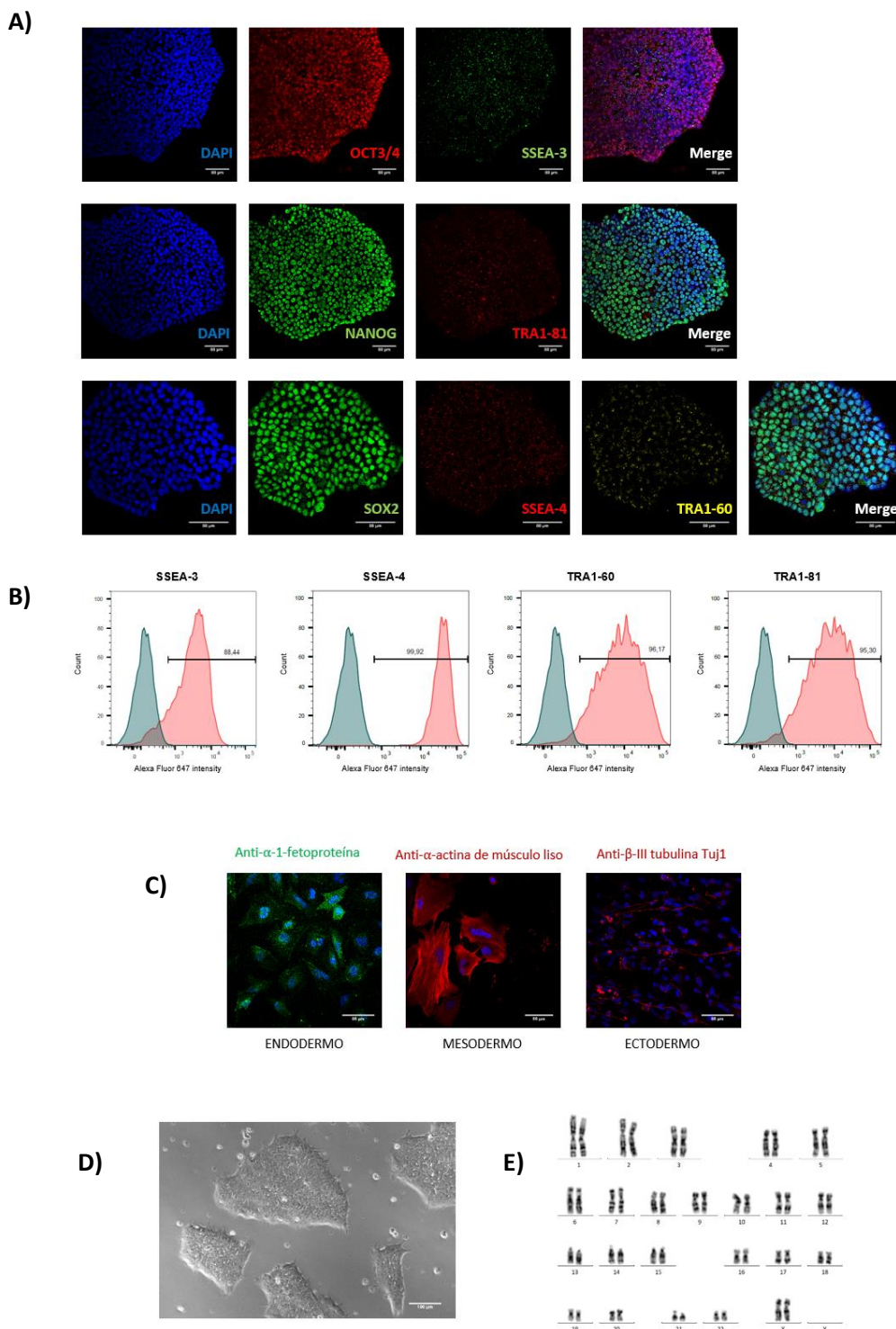


Figura 29. Caracterización de la línea de iPSC PCCB WT-isogénico. (A) Detección por inmunofluorescencia de los marcadores de pluripotencia NANOG, OCT3/4, SOX2, SSEA3, SSEA4, TRA1-60 y TRA1-81. (B) Análisis por citometría de flujo de los marcadores de superficie SSEA3, SSEA4, TRA1-60 y TRA1-81. (C) Análisis por inmunofluorescencia de los marcadores de las 3 capas germinales. (D) Imagen representativa de las colonias de iPSC adaptadas a matrigel. (E) Estudio del cariotipo donde muestra la disposición de las 23 parejas de cromosomas en metafase con el patrón de bandas G propio de cada uno tras la tinción de Giemsa.

DISCUSIÓN

1. Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de cardiomiopatías en AP: papel de los miRNAs y nuevas aproximaciones terapéuticas

Las alteraciones cardiacas que pueden conducir al desarrollo de FC constituyen una de las principales complicaciones observadas en los pacientes de AP. La aparición de estas cardiomiopatías es una alteración común presente no solamente en aquellos pacientes que manifiestan la enfermedad de forma neonatal, sino que también se desarrolla en pacientes con formas más suaves de la enfermedad o incluso asintomáticos (Laemmle et al., 2014, Riemersma et al., 2017). No obstante, pese a que las cardiomiopatías tienen una elevada incidencia en AP, no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo de estas alteraciones. Por ello, se hace especialmente importante dilucidar estos mecanismos con el objetivo de encontrar nuevos métodos de seguimiento, biomarcadores y tratamientos que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad.

El estudio de la estructura y función cardiaca por ecocardiograma es una técnica eficaz que permite analizar distintos parámetros para determinar un correcto funcionamiento del corazón o la presencia de cardiomiopatías (Moran et al., 2013). Los estudios llevados a cabo por ecocardiograma sobre el modelo murino de AP reflejan indicios de remodelado cardiaco y de la presencia de disfunción cardiaca. A nivel de la estructura del corazón, la normalización de los parámetros IVSd, LVPW y LVID por el peso de los ratones permitió eliminar la variabilidad entre individuos, al mismo tiempo que subraya las posibles diferencias existentes entre los ratones WT y AP, dado que estos últimos sufren un retraso en el crecimiento, como consecuencia de la propia enfermedad. Así, un aumento en estos valores podría reflejar la presencia de alteraciones en el miocardio, como CH o DCM. No obstante, serían necesarios estudios adicionales mediante técnicas de imagen más sensibles, así como análisis de la histología del tejido para confirmar la presencia de remodelado cardiaco.

En términos de la función sistólica, la disminución progresiva de los valores de FE y FS indican una caída en la capacidad contráctil del corazón. La relación E/A (cociente entre las ondas de llenado ventricular temprano y tardío) es uno de los parámetros más comúnmente utilizados para determinar la función diastólica, junto con el parámetro E/E' (relación entre el llenado temprano y pasivo del ventrículo izquierdo) (Schnelle et al., 2018). Nuestros resultados muestran como un mayor porcentaje de ratones AP se encuentra fuera del rango de normalidad en la relación E/A, lo cual sería indicativo de disfunción diastólica. Además, se produce también una reducción del volumen telediastólico, lo que indicaría que existe un menor llenado de los ventrículos durante la

fase de relajación. Esta alteración en la función cardiaca podría ser considerada como un paso previo al establecimiento del FC.

La presencia prolongada de estímulos patológicos sobre el corazón inicia un proceso de remodelado cardiaco en el que se incluyen las alteraciones en la estructura, tamaño, morfología y función de las células del corazón (cardiomiocitos, fibroblastos, y células del sistema inmune), y que engloba todos los procesos celulares y genéticos que tienen lugar en este órgano (Haque, Wang, 2017). De esta manera, el estrés continuo al que se ve sometido el corazón provoca una reprogramación genética en la que se produce un aumento de la expresión de genes fetales, la sobreactivación de vías de señalización (PI3K-AKT, Ca^{2+} -CnA o la ruta de las MAP kinasas, entre otras), un aumento en la síntesis de proteínas, cambios metabólicos, aumento del depósito de proteínas de matriz extracelular, etc. Es precisamente la combinación de todos estos factores la que determina la respuesta funcional global del corazón.

Nuestros resultados muestran como en los ratones AP a cinco meses de edad se produce un incremento en la expresión de marcadores habituales utilizados para confirmar el daño cardiaco (*Nppa*, *Nppb* y *Myh7*) y fibrosis (*Col1a1* y *Col3a1*), lo que, en conjunto con los estudios de ecocardiograma, permiten confirmar el desarrollo de alteraciones cardiacas en el ratón AP. Además, se confirma la sobreactivación de la ruta PI3K-AKT y la inhibición de la vía de las kinasas de estrés en los ratones AP, que podrían ayudar a explicar las alteraciones cardiacas observadas.

En relación a la vía PI3K-AKT y su implicación en el remodelado cardiaco, la activación de esta cascada de señalización se ha asociado normalmente con la estimulación de una respuesta fisiológica adaptativa, aunque no se puede descartar que la activación constitutiva pueda estar presente o desencadenar la desregulación de otras vías durante el remodelado patológico. El inicio de la señalización se produce por la activación de la proteína PI3K, que promueve la fosforilación del fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) a inositol trifosfato (PIP₃), que actúa como desencadenante para la fosforilación y activación de AKT por acción de PDK1. A continuación, AKT provoca por un lado la activación de rutas de supervivencia y crecimiento celular, así como un aumento de la síntesis de proteínas e inhibición de la autofagia a través de la acción de mTOR. Existen varios terminadores de la señal, entre los que destaca la acción de la fosfatasa PTEN, que permite la desfosforilación del PIP₃, provocando así la desactivación de AKT (Figura 30) (Aoyagi, Matsui, 2011, Heineke, Molkentin, 2006). Los resultados obtenidos del análisis de la vía PI3K-AKT en los ratones AP muestran un incremento en la expresión de los genes *Jun* y *Fos*, los cuales codifican para dos factores de transcripción que se asocian para constituir el complejo AP-1, implicado en la transcripción de genes de supervivencia y crecimiento celular. Por otra parte, se observa una

desregulación en la expresión de genes relacionados con el factor NFκB, lo cual podría ser indicativo de la presencia de inflamación, proceso que ha sido relacionado con el desarrollo de FC y fibrosis (Zhao, Q. D. et al., 2015). Finalmente, se observa también un descenso en los niveles de expresión de terminadores de la señalización como *Pten*, o bien de inhibidores de mTOR como *Tsc2*, lo que indicaría una mayor activación de la ruta (Aoyagi, Matsui, 2011). Por tanto, estos resultados en conjunto reflejarían la alteración global de la vía PI3K-AKT en el modelo murino de AP, lo que podría contribuir al establecimiento de la patología cardíaca.

Por otra parte, las quinasas de estrés como p38 y JNK se han asociado con el remodelado cardíaco debido a su capacidad para transducir señales iniciadas por agentes tóxicos o patológicos. No obstante, debido a que participan en la integración de múltiples señales y procesos, se ha descrito un carácter dual de estas quinasas. Así, la inhibición tanto de p38 como de JNK se ha asociado con el inicio de un programa de remodelado cardíaco a través de su interacción con el factor de transcripción NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) (Braz et al., 2003, Liang et al., 2003). También se ha descrito que su activación puede suponer un aumento del remodelado cardíaco a través de la interacción con otros factores de transcripción de rutas relacionadas como AP-1 y MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) (Figura 30) (Dionyssiou et al., 2013). Los factores de transcripción NFAT y MEF2 se engloban en la ruta canónica de Ca²⁺-CnA, y participan en el control de la expresión de genes fetales. En condiciones basales, NFAT aparece inhibido por hiperfosforilación que impide su migración al núcleo, mientras que MEF2 forma un complejo inhibitorio con la proteína HDAC4 (histona deacetilasa 4). El incremento de la concentración intracelular de Ca²⁺ provoca la activación de la fosfatasa CnA, que, por un lado, desfosforila a NFAT y permite su migración al núcleo donde actúa como factor de transcripción, mientras que por otro lado también produce la activación de la CaMK (calcio-calmodulina quinasa), que fosforila e inhibe a HDAC permitiendo la liberación de MEF2. Por tanto, la activación de estos dos factores de transcripción va a promover la formación de complejos que aumentarían la expresión de genes fetales como *Myh7*, *Nppa* y *Nppb*, sobreexpresados en AP. Finalmente, la refosforilación de NFAT por las quinasas p38, JNK, GSK3β y PKA provocará su inhibición, mientras que la desfosforilación de HDAC4 bloqueará la acción de MEF2. Por ello, la inhibición de la activación de las quinasas p38 y JNK observada en el corazón de los ratones AP podría ser la responsable de la activación constitutiva de estas vías de remodelado cardíaco, siendo necesarios estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

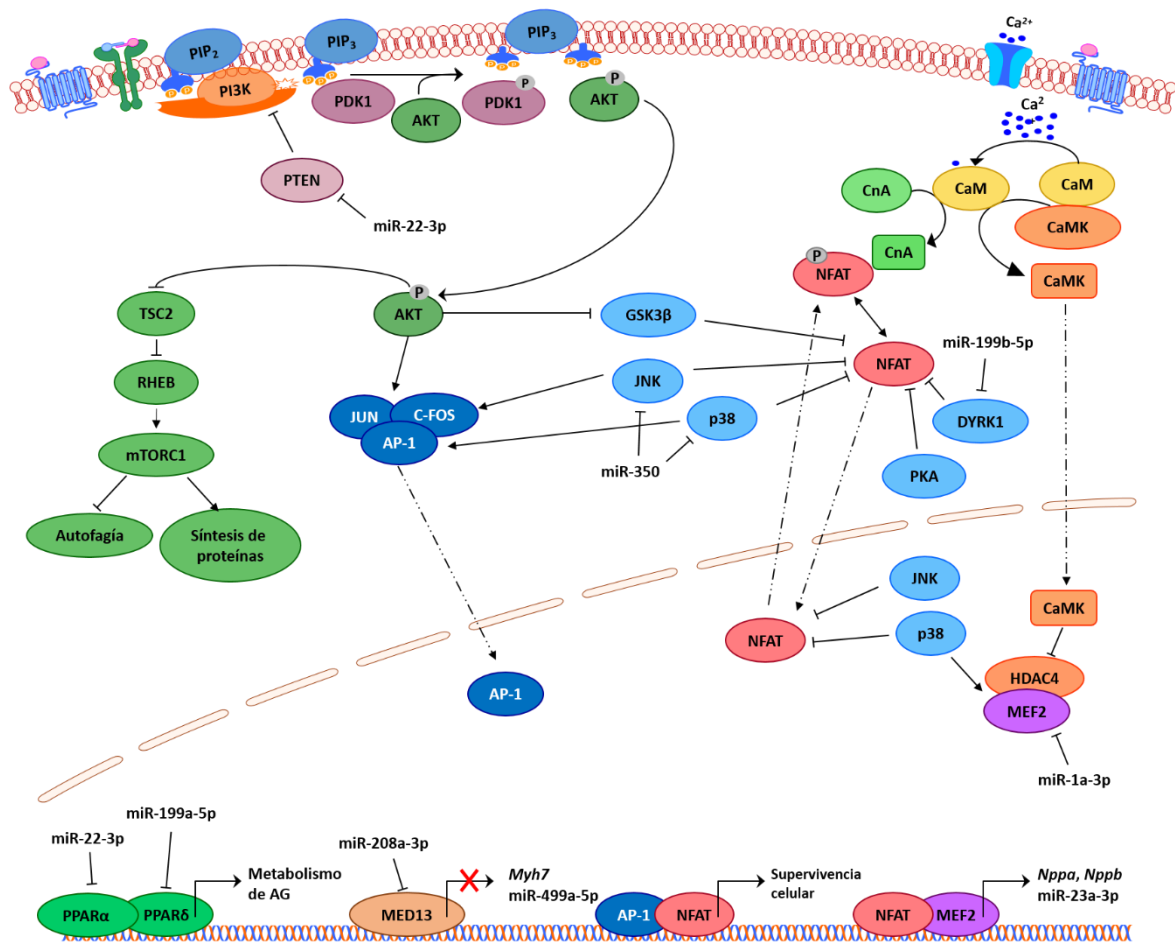


Figura 30. Esquema resumen de las vías de señalización de remodelado cardíaco: regulación e implicación de miRNAs. Los mecanismos moleculares que promueven la activación del remodelado cardíaco están sometidos a regulación cruzada, lo que aumenta la complejidad de las vías de señalización. Asimismo, los miRNAs constituyen un mecanismo adicional de regulación de estas vías a través de su capacidad para modular los niveles de sus proteínas diana, alterando el equilibrio activación-inhibición. Las líneas punteadas indican traslocación a compartimentos celulares diferentes. AG: ácidos grasos; AKT: proteína quinasa B; AP-1: complejo JUN-FOS; CaM: calmodulina; CaMK: calmodulina quinasa; CnA: calcineurina; GSK3β: *glycogen synthase kinase 3 beta*; HDAC4: histona deacetilasa 4; MED13: *thyroid hormone receptor associated protein*; MEF2: *myocyte enhancer factor 2*; mTOR: *mammalian target of rapamycin*; NFAT: *nuclear factor of activated T cells*; PI3K: fosfoinositol 3 quinasa; PIP2: inositol 4,5-bisfosfato; PIP3: inositol-3,4,5-trifosfato; PKA: proteína quinasa A; PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptor*; TSC2: *tuberous sclerosis complex 2*.

Dado que los miRNAs participan en el control de todos los procesos fundamentales de la biología cardiovascular, se ha comprobado que en el desarrollo de las patologías cardíacas se produce una desregulación en los niveles de expresión de miRNAs que contribuyen al establecimiento de la enfermedad (Condorelli, Latronico & Cavarretta, 2014, Orenes-Pinero et al., 2013). Nuestros resultados confirmaron el aumento en los niveles de expresión de 13 miRNAs de expresión mayoritaria en corazón (excepto el miR-338-3p, de expresión ubicua) que podrían estar contribuyendo al desarrollo de las cardiomiopatías observadas en el modelo murino de AP. Los cardiomiRs seleccionados para este estudio desempeñan papeles que han sido asociados con el desarrollo de

patologías cardíacas (Wang, J. et al., 2016), y además participan en la regulación de proteínas asociadas a las vías de remodelado anteriormente explicadas. No obstante, los resultados obtenidos reflejan que a nivel individual es más difícil valorar el efecto ejercido por un único miRNA, y que por tanto el fenotipo fisiopatológico observado en el modelo murino sería consecuencia del impacto combinado de varios miRNAs sobre las mismas vías de señalización. Por ello, este trabajo constituye una de las primeras evidencias que liga la implicación de miRNAs con el desarrollo de alteraciones cardíacas en AP.

Uno de los miRNAs que presenta un mayor incremento en su expresión es el miR-208a-3p, el cual ha sido asociado con el desarrollo de cardiomiopatías (Satoh et al., 2010). Se trata de un miRNA de expresión específica cardíaca codificado en el intrón 27 del gen *Myh6*, que da lugar a la isoforma α de la cadena pesada de la miosina (α -MHC). La expresión de este miRNA está altamente relacionada con la activación de vías de remodelado cardíaco, ya que entre sus dianas potenciales se encuentran inhibidores del crecimiento muscular como la miostatina (Callis et al., 2009), y represores transcripcionales como *Med13/Thrap1* (*thyroid hormone receptor associated protein*) (van Rooij et al., 2009), gen cuya expresión aparece disminuida en el corazón de los ratones AP. La disminución en la expresión de *Med13* como consecuencia de la acción del miR-208a-3p podría estar implicada en el aumento de la expresión del *Myh7* y del miR-499 (Figura 30). Este miRNA se ha asociado como un efector aguas abajo del miR-208a-3p, y podría contribuir al desarrollo de cardiomiopatías a través de la desregulación de diferentes kinasas y fosfatas, alterando los niveles de activación de las kinasas de estrés y la vía PI3K-AKT (Matkovich et al., 2012).

Los miR-199a-5p y miR-199b-5p son dos miRNAs que pertenecen a la misma familia, y aunque presenta una distribución más amplia entre tejidos, están altamente enriquecidos en el músculo esquelético y miocardio, por lo que han sido asociados con procesos de remodelado cardíaco. El miR-199a-5p, codificado dentro del gen *Dnm3*, participa en el control del metabolismo energético mediante la regulación de su diana *Ppard* (Figura 30) (el Azzouzi et al., 2013), la cual presenta una disminución estadísticamente significativa en el corazón de los ratones AP. El gen *Ppard* codifica para el factor de transcripción PPAR δ , implicado en la biogénesis mitocondrial y en el metabolismo lipídico, de forma que una reducción en sus niveles podría desregular este tipo de metabolismo, forzando al corazón al consumo de glucosa, característica típica del FC. Asimismo, se ha demostrado que el miR-199a-5p ejerce un efecto inhibitorio sobre la autofagia a través de la activación de mTOR, lo que potenciaría el crecimiento hipertrófico del cardiomiocito (Li, Z. et al., 2017). Por otra parte, el miR-199b-5p, codificado dentro del gen *Dnm1*, podría contribuir al desarrollo de alteraciones cardíacas en el modelo murino de AP a través de la reducción de los niveles de la

proteína DYRK1, kinasa encargada de iniciar la fosforilación e inhibición del factor NFAT (Figura 30) (da Costa Martins et al., 2010).

Otro de los miRNAs que presentan un mayor incremento en sus niveles de expresión es el miR-22-3p. Se trata de un miRNA codificado en el interior de un lncRNA, de expresión en diferentes tejidos, pero enriquecida a nivel del músculo esquelético y cardíaco. Su participación en el remodelado cardíaco está ligada a través de diferentes acciones. Por un lado, se ha postulado que este miRNA regula la traducción de *Pten* (Xu et al., 2012), lo que explicaría el descenso observado en el modelo murino de AP (Figura 12). Por otra parte, este miRNA participa en el control metabólico y energético de la célula a través de la regulación de los niveles de *Sirt1* y *Ppara* (Figura 30) (Gurha et al., 2013). De esta manera, el aumento en los niveles del miR-22-3p podría causar un descenso en los niveles de los factores de transcripción PGC1- α (*peroxisome proliferator-activated receptor coactivators 1*), PPAR α y ERR α (*estrogen-related receptors*), hecho que conduciría a una depleción del consumo de ácidos grasos en detrimento de glucosa. Asimismo, ERR α participa en el control de la expresión de proteínas implicadas en el manejo del Ca²⁺ (SERCA2a, RyR), si bien nuestros resultados de proteómica no detectan variaciones en los niveles de estas proteínas. Finalmente, el miR-22-3p inhibe la síntesis de HDAC4 (Huang, Z. P. et al., 2013), lo que liberaría al factor de transcripción MEF2 que, junto con NFAT, regularía la transcripción de genes implicados en remodelado cardíaco. Entre estos genes se encontraría el miRNA miR-23a-3p, cuya expresión aparece aumentada en AP y que cuenta con un sitio de unión para NFATc3 en su promotor (Figura 30). Este miRNA está implicado en procesos de remodelado cardíaco a través de la inhibición de la proteína MuRF1, de función anti-hipertrófica (Lin et al., 2009).

En relación al miR-350, se trata de un miRNA específico de roedores codificado en uno de los intrones del gen *CEP-170*. La relación del miR-350 con el desarrollo de alteraciones cardíacas se ha establecido a través de la regulación que ejerce sobre los niveles de las kinasas de estrés p38 y JNK (Figura 30) (Ge et al., 2013). Nuestros resultados reflejan que no solo se produce una reducción en la activación de estas kinasas (Figura 13), sino que también se produce una disminución en los niveles totales de estas proteínas como consecuencia de la acción de este miRNA. Por tanto, el doble efecto generado sobre estas proteínas podría conducir a una activación sostenida en el tiempo de la transcripción regulada por NFAT. Por otra parte, el miR-338-3p está codificado en un intrón del gen *AATK* (*apoptosis-associated tyrosine kinase*), y se trata de un miRNA que regula componentes de la maquinaria de la fosforilación oxidativa (Aschrafi et al., 2008), la cual se ha demostrado alterada en el tejido cardíaco de los ratones AP (Gallego-Villar et al., 2016), y que ha sido confirmada a través del análisis sobre la proteína ATP5G1, diana del miR-338-3p. No obstante, dado que se trata de dos miRNAs apenas estudiados en el contexto de patologías cardíacas,

decidimos analizar la regulación directa de estas dianas mediante ensayos de validación funcional, lo que permitió confirmar la implicación de estos miRNAs en la regulación de genes diana relacionados con la fisiopatología de AP.

Por último, nuestros resultados muestran también un incremento en la expresión de miRNAs que ejercerían un efecto protector frente al remodelado cardiaco y la apoptosis. Este es el caso de los miRNAs miR-1-3p y miR-133a-3p (codificados dentro del mismo clúster), el miR-378-3p y el miR-29a-3p. Mientras que el miR-1-3p ejercería un efecto anti-hipertrófico a través de la regulación del factor de transcripción MEF2 (**Figura 30**) (Ikeda et al., 2009), el miR-378-3p produciría una reducción directa de los niveles de caspasa 3 en AP, lo que limitaría el grado de muerte celular y remodelado cardiaco (Fang et al., 2012). El miR-133a-3p provocaría una reducción de la apoptosis a través de la disminución de los niveles de la caspasa 9 (Wang, L. et al., 2014), proteína iniciadora de la ruta de apoptosis que permite la activación de la caspasa 3. No obstante, serían necesarios estudios adicionales que permitieran determinar el grado de activación de estas caspasas. Por último, el miR-29a-3p desempeña un papel como inhibidor de la fibrosis a través de la regulación de los colágenos (van Rooij et al., 2008), si bien nuestros resultados reflejarían que la sobreexpresión directa de este miRNA no parece ser suficiente para prevenir el desarrollo de fibrosis en los ratones AP. En general, debido a la acción protectora de estos miRNAs, su sobreexpresión podría ser considerada como un mecanismo compensatorio para tratar de frenar el desarrollo de cardiomiopatías en los ratones AP.

El estudio sobre la desregulación de miRNAs y sus dianas potenciales en vías de señalización relacionadas con cardiomiopatías no solo permite conocer más acerca de los mecanismos moleculares de la sintomatología cardiaca en AP, sino que también proporciona una nueva aproximación terapéutica a través de la modulación de la expresión de estos cardiomiRs. En este contexto, adquiere especial interés el miR-208a-3p, dado que se trata de uno de los principales miRNAs implicados en funciones mecánicas y electrofisiológicas, así como en la regulación de la respuesta cardiaca a estrés (Oliveira-Carvalho, Carvalho & Bocchi, 2013). Así, se ha demostrado que la inhibición de la expresión del miR-208a-3p es un mecanismo eficaz para prevenir el desarrollo de remodelado cardiaco y disfunción ventricular en diferentes modelos de patología cardiovascular, sin alterar en ningún momento la función electrofisiológica del corazón (Grueter et al., 2012, Montgomery et al., 2011). Por tanto, la modulación de este miRNA podría tener efectos beneficiosos en AP.

No obstante, nuestros resultados reflejan que, en las condiciones iniciales ensayadas, el tratamiento con un *LNA-antimiR-208a* no es suficiente para prevenir el desarrollo de alteraciones

cardiacas o la sobreexpresión de genes fetales o de miRNAs relacionados en el modelo murino de AP. Este hecho podría deberse a diversos factores: en primer lugar, el tratamiento se inicia cuando ya existe una desregulación en la expresión del miR-208a, por lo que podría ocurrir que los niveles de este miRNA fueran lo suficientemente elevados como para que la dosis administrada y la pauta de administración no fueran suficientes para revertir el desarrollo de la patología. En segundo lugar, existe una redundancia funcional entre el miR-208a-3p y miR-499a-5p, por lo que solamente la inhibición del miR-208a-3p no sería suficiente para prevenir o revertir el daño cardíaco existente (Matkovich et al., 2012). Este fenómeno ha sido demostrado a través de estudios funcionales sobre la familia del miR-34, también implicada en patología cardiovascular. En este contexto, la inhibición sola del miR-34a-3p permite una reversión de las alteraciones funcionales solamente en patologías cardiovasculares moderadas (Bernardo et al., 2014), mientras que es la inhibición completa de la familia de este miRNA (miR-34a, miR-34b y miR-34c) la que ha mostrado un mayor potencial terapéutico (Bernardo et al., 2012). Por tanto, serían necesarios estudios adicionales en los que se produjera una modulación combinada de la expresión de varios miRNAs para valorar su potencial terapéutico en la sintomatología cardíaca de AP.

Además de su potencial terapéutico, la capacidad de liberación de miRNAs por parte de diferentes tejidos al torrente circulatorio abre su posible aplicación como biomarcadores para distintas enfermedades. Por esta razón, decidimos analizar el perfil de cardiomiRs, previamente identificados en el modelo murino de AP, en muestras de plasma de controles y de pacientes de la enfermedad. En un primer paso se confirmó la ausencia de hemólisis en nuestras muestras a través del análisis de miRNAs propios de células sanguíneas, ya que se trata de un proceso común que puede interferir con los resultados obtenidos. No obstante, si bien en este estudio se incluyeron todos aquellos miRNAs considerados como circulantes, algunos de estos cardiomiRs como el miR-208a-3p no pudieron detectarse en nuestras muestras, debido a las limitaciones propias de la técnica.

El análisis de miRNAs circulantes en las muestras de plasma de pacientes de AP revela un perfil de expresión diferente al observado en el corazón de los ratones AP, ya que se detecta una disminución en los niveles de los cardiomiRs miR-22-3p, miR-29a-3p, miR-133a-3p, y miR-199a-5p. Estas diferencias en los niveles de expresión entre tejidos y plasma es común a otras enfermedades como la distrofia muscular de Duchenne (Roberts et al., 2012), de tal manera que los niveles de los miRNAs en fluidos corporales no siempre reflejan los niveles intracelulares y podrían constituir una respuesta biológica dentro del organismo. Sin embargo, no podemos descartar la hipótesis de que estas variaciones puedan deberse también a las diferencias existentes en los mecanismos regulatorios entre ratones y humanos.

Uno de los principales inconvenientes en AP es que, pese a que existen marcadores bien definidos para el diagnóstico de la enfermedad, no se dispone de marcadores que permitan evaluar el seguimiento, la prognosis o la respuesta a tratamientos. En este sentido, cobran especial relevancia los miRNAs. No obstante, aún existe una serie de limitaciones, ya que, en primer lugar, el bajo número de muestras analizadas impide establecer su uso como biomarcadores por el momento, aunque abre la posibilidad de utilizarlos en el futuro una vez sean validados en un mayor número de pacientes. Además, la técnica de qRT-PCR cuenta con una serie de limitaciones, de tal manera que miRNAs con un bajo nivel de expresión o sin sondas u oligonucleótidos específicos pueden no ser detectados. Por ello, es necesario también desarrollar técnicas como la secuenciación masiva que permitan identificar los niveles de estos miRNAs de forma más precisa, aunque esto limitaría su uso rutinario como biomarcadores a nivel asistencial. Sin embargo y pese a estas limitaciones, nuestros resultados reflejan que 9 de los 10 pacientes analizados presentan un patrón común de desregulación de miRNAs en plasma. Sorprendentemente, el único paciente (P2) sometido a tratamiento para frenar la sintomatología cardíaca durante el periodo de recolección de las muestras presenta un perfil de expresión de miRNAs diferente, lo que reflejaría el potencial uso de los miRNAs para ser utilizados en la monitorización de la respuesta de los pacientes. Por tanto, nuestros resultados constituyen un punto de partida para la utilización de miRNAs como biomarcadores específicos para la sintomatología cardíaca en AP.

Actualmente, se desconocen los mecanismos moleculares que provocan la desregulación de miRNAs en el contexto fisiopatológico de AP. No obstante, nuestros resultados han identificado al propionato como un posible factor iniciador de la desregulación de la expresión de miRNAs y del daño cardíaco producido en AP, si bien no puede descartarse la participación de otros mecanismos que conduzcan a estas alteraciones. La incubación prolongada de los cardiomiocitos HL-1 con propionato es capaz de inducir un incremento en la expresión de 3 de los 4 miRNAs que presentan mayor incremento en sus niveles en el modelo murino de AP. Este hecho podría ser consecuencia del papel del propionil-CoA como regulador del patrón de acetilación de histonas a través de sus efectos como inhibidor de HDACs (Nguyen et al., 2007), así como por su capacidad para promover la activación de histonas acil-transferasas que aumentan la propionilación de histonas, activando así la transcripción (Kebede et al., 2017). De esta manera, la acumulación del propionil-CoA como consecuencia del defecto en PCC se podría traducir en un mayor grado de accesibilidad de la cromatina a factores de transcripción que permitirían, entre otros efectos, un incremento en la expresión de miRNAs.

Por otro lado, el incremento en la producción de ROS puede considerarse como un segundo mecanismo capaz de producir la desregulación en la expresión de miRNAs. Nuestros resultados

reflejan que la acumulación de propionato en los cardiomiocitos HL-1 provoca un incremento en la producción de ROS y daño oxidativo, observado previamente en modelos celulares y animales de AP (Gallego-Villar et al., 2014, Gallego-Villar et al., 2016). La acumulación de ROS no solamente produciría daño a nivel de lípidos y DNA, sino que también sería capaz de inducir una activación de distintas vías de señalización y factores de transcripción que podrían promover el aumento de la expresión de estos miRNAs. De hecho, se ha demostrado que los niveles de expresión del miR-208a-3p están regulados por los niveles de ROS en el interior celular (Liu, Sun & Yu, 2018).

Por otro lado, es interesante resaltar que el daño oxidativo a proteínas con un papel clave en función cardiaca puede contribuir directamente al fenotipo cardiaco observado en AP. En este sentido, los resultados obtenidos del análisis proteómico de las modificaciones post-traduccionales muestran a la proteína SERCA2a como un posible candidato responsable de la contribución al FC y desarrollo de arritmias en AP. Así, un primer mecanismo para explicar la participación de esta proteína en el desarrollo de alteraciones cardiacas radica en la regulación de su activación por oxidación o modificaciones postraduccionales. El análisis de proteómica revela un incremento en la oxidación y detiometilación de metioninas que podría conducir a una disminución de su función alterando los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Zima, Blatter, 2006). No obstante, serían necesarios estudios adicionales mediante el empleo de antioxidantes en modelos celulares de AP para comprobar que este incremento en la oxidación de SERCA2a se traduce directamente en una inhibición de su función. Por otro lado, la disfunción mitocondrial observada en AP provoca una reducción de la producción de energía en forma de ATP. En el corazón y como consecuencia del estrés al que se ve sometido, este déficit de ATP se acentúa debido a la reprogramación metabólica hacia el consumo de glucosa (Zhou, Tian, 2018). Esta depleción de ATP sería responsable de que la proteína SERCA2a no dispusiera del sustrato necesario para la captación de Ca^{2+} y su almacenamiento en el RS. De esta manera, el defecto en la acción de SERCA2a por cualquier mecanismo provocaría una disminución de la cantidad de Ca^{2+} almacenada en el RS. Así, ante los sucesivos ciclos de contracción, habría una menor liberación de Ca^{2+} haciendo que la contracción muscular sea menos eficiente desembocando finalmente en FC. Además, la inhibición de SERCA2a también causaría un incremento en la concentración basal de Ca^{2+} intracelular, que podría provocar un aumento de la activación espontánea de la proteína RyR, liberándose Ca^{2+} durante el proceso de relajación. Este hecho generaría finalmente la aparición de arritmias y latidos ventriculares ectópicos, sintomatología que encontramos en los pacientes de AP. En este sentido, los trabajos realizados en colaboración con el grupo de la Dra. Carmen Delgado confirmarían esta hipótesis, observando una reducción de la capacidad contráctil del corazón en los ratones AP asociada a disminución en la liberación de Ca^{2+} durante el proceso de sístole, así como a una menor capacidad

de la proteína SERCA2a para promover su recaptación. Estas alteraciones se correlacionan con un incremento en la liberación de Ca^{2+} durante la diástole y la detección de un mayor número de eventos proarritmogénicos en los cardiomiocitos de los ratones AP (Tamayo et al., 2020).

La disfunción mitocondrial secundaria provocada en parte por la inhibición de enzimas mitocondriales como consecuencia de la acumulación del propionil-CoA se ha indicado como una de las principales fuentes en la producción de ROS en AP. Por ello, el tratamiento con fármacos dirigidos a estimular la función mitocondrial o reducir la producción de ROS podría constituir una nueva aproximación terapéutica en AP. Así, estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado que la terapia con los antioxidantes mitoQ y resveratrol reduce el daño oxidativo, mejora la defensa antioxidante y promueve una reducción del daño cardíaco en AP, reflejado a través de la reducción del marcador BNP (Rivera-Barahona et al., 2018). Teniendo en cuenta los datos obtenidos de los estudios anteriores, en este trabajo nos planteamos evaluar el efecto terapéutico del activador de la biogénesis y función mitocondrial bezafibrato.

El bezafibrato es un fármaco perteneciente a la familia de los fibratos. Estos compuestos son utilizados en el tratamiento de hiperlipidemias por su capacidad para reducir la proporción de lípidos y colesterol en sangre. Su mecanismo de acción consiste en una activación de los factores de transcripción PPAR, implicados en el eje de señalización PGC-1 α / β . La activación de este eje va a promover un incremento en la expresión de diversos factores de transcripción entre los que se encuentran los PPAR, ERR, NRF (*nuclear respiratory factors*) y TFAM, todos ellos implicados en la regulación de genes que participan en el metabolismo energético y biogénesis mitocondrial (Di et al., 2018).

Debido a la capacidad del bezafibrato de estimular la activación del eje PGC-1 α -PPAR, este compuesto ha sido utilizado como agente terapéutico en el estudio de enfermedades humanas caracterizadas por la presencia de disfunción mitocondrial. Así, el bezafibrato se ha mostrado eficaz para reducir la acumulación de lípidos y mejorar la dinámica mitocondrial en modelos celulares derivados de pacientes con defectos en la proteína trifuncional mitocondrial (Djouadi et al., 2016, Yasuno et al., 2014) o en la carnitina palmitoiltransferasa 2 (Yasuno et al. 2014) o en modelos generados por sobreexpresión de mutaciones en el gen *DNM1L* (Douiev et al., 2020). En relación a sus efectos *in vivo*, se ha observado una mejora de la supervivencia y sintomatología neurológica en modelos animales de la enfermedad de Huntington (Johri et al., 2012), así como un incremento de la biogénesis mitocondrial y una recuperación de la función y fenotipo cardíaco en modelos de la enfermedad metabólica del Síndrome de Barth (Huang, Y. et al., 2017, Schafer et al., 2018).

En este trabajo nos hemos centrado en analizar el posible efecto terapéutico del bezafibrato para revertir el desarrollo de las alteraciones cardiacas observadas en el modelo murino de AP. Los resultados tras el tratamiento reflejan que no existen diferencias significativas entre los ratones WT y AP en la expresión de marcadores de biogénesis mitocondrial, y que además ambos grupos de ratones mantienen también un perfil similar de expresión de cardiomiRs. Esto podría explicarse por el hecho de que la desregulación máxima de los niveles de miRNAs en el ratón AP es a 5 meses y tiende a normalizarse con el paso del tiempo (Figura 15). Esta normalización podría ser causada por el proceso de envejecimiento, en el cual se produce la activación de una serie de cascadas de señalización que conducen al crecimiento celular del cardiomiocito, así como se promueve el metabolismo glucolítico y se reduce la fosforilación oxidativa, entre otros procesos (Lesnefsky, Chen & Hoppel, 2016). No obstante, sí se observa el efecto del bezafibrato a través de la inducción en los ratones AP de la expresión de los genes *Ppara*, *Ppard*, *Esrra* y *Nrf1* implicados en el control del metabolismo de ácidos grasos, glucosa y fosforilación oxidativa. Asimismo, el miR-199a-5p, estrechamente relacionado con el metabolismo energético y la regulación de *Ppard*, presenta una disminución en su expresión tras el tratamiento con bezafibrato.

Por otra parte, la técnica RPPma nos permitió valorar el efecto del bezafibrato en la función y homeostasis celular a través del análisis de proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial, las defensas antioxidantes y enzimas del metabolismo energético y fosforilación oxidativa. Esta técnica se basa en la cuantificación de proteínas implicadas en el metabolismo energético celular, y ha sido utilizada para definir el perfil bioenergético en patologías como cáncer (Aldea et al., 2011), enfermedades neuromusculares (Santacatterina et al., 2015) y desórdenes mitocondriales (Santacatterina et al., 2018).

La alteración en la producción de energía es una de las características propias del desarrollo de cardiomiopatías, reflejado en la alteración de los niveles de proteínas de la CTE y una reprogramación metabólica hacia el consumo de glucosa (Tham et al., 2015). Así, en el ratón AP se produce un incremento del inhibidor de la ATPasa IF1, lo que causaría una mayor inhibición de la respiración mitocondrial desplazando el metabolismo hacia la glicolisis (Formentini et al., 2012). Por otro lado, los ratones AP presentan una reducción del complejo III (CORE2) de la CTE, lo cual puede ser debido a la acción inhibitoria del propionil-CoA sobre este complejo (Gallego-Villar et al., 2016, Richard et al., 2015). Pese a que el bezafibrato actuaría como un inductor de la función mitocondrial, los resultados obtenidos parecen provocar solo una recuperación parcial del metabolismo mitocondrial, ya que solamente se observa una recuperación de los niveles de CORE2. Los niveles elevados de IF1 podrían considerarse como un mecanismo compensatorio para prevenir la hidrólisis del ATP por la función hidrolasa de la ATP sintasa, conservando unas reservas

energéticas altas para mantener la función cardíaca (Esparza-Moltó, Cuezva, 2018). Esta reprogramación metabólica se observa también en el incremento de enzimas glicolíticas como GAPDH y ENO1. No obstante, el tratamiento con bezafibrato podría inducir una mejora del metabolismo energético mitocondrial, reduciendo así la necesidad de la activación de rutas glicolíticas. De igual manera, los ratones AP muestran una sobreexpresión de enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos. Debido a que el defecto en PCC impide, entre otros, el metabolismo de ácidos grasos de cadena impar, podría producirse una activación de diversas enzimas que tratasen de captar electrones desde distintas fuentes para aportarlos a la CTE y paliar el déficit de ATP. Así, la inducción del metabolismo mitocondrial como consecuencia del tratamiento con bezafibrato explicaría la recuperación de los niveles de enzimas como ETFA y GPD1.

La dinámica mitocondrial incluye los procesos de fusión (unión) y fisión (división) de estos orgánulos celulares, y su equilibrio es fundamental para que haya un correcto funcionamiento de la mitocondria. Este proceso está regulado por varias proteínas, entre las que se encuentra la MFN2, de tal manera que un incremento en esta proteína promueve una alteración en el equilibrio de la dinámica mitocondrial, así como una fusión con otros orgánulos como el RS, con efectos perjudiciales especialmente en corazón (Marín-García, Akhmedov, 2016). Por tanto, el aumento en los niveles de MFN2 en AP podría contribuir al desarrollo de alteraciones cardíacas, destacando que el tratamiento con bezafibrato se muestra efectivo para reducir estos niveles, recuperando la dinámica mitocondrial. Por otro lado, el bezafibrato tiene la capacidad de reducir la producción de ROS y el daño oxidativo a través de la estimulación de la función mitocondrial. De esta manera y aunque no se trata de un antioxidante, el tratamiento con bezafibrato podría resultar efectivo para reducir el estrés oxidativo detectado en el modelo murino de AP. Nuestros resultados confirman esta hipótesis a través de la reducción en la expresión de las proteínas antioxidantes PRX3 y especialmente TXN, encargada de reducir las oxidaciones proteicas por lo que supone el principal marcador de daño oxidativo. No obstante, el tratamiento con bezafibrato no corrige el defecto primario a nivel de la PCC, por lo que sigue existiendo un ambiente oxidativo que explicaría que no exista una reducción de los niveles de SOD1, SOD2 y PRX6.

En conclusión, nuestros resultados aportarían las primeras evidencias acerca del papel potencial de activadores de la biogénesis y función mitocondrial en el tratamiento preventivo de las cardiomiopatías y posiblemente de otras alteraciones de la AP, siendo necesarios otros estudios para identificar otros compuestos más efectivos como la pioglitazona (Bilginoglu, 2019) o el dimetilfumarato (Fu et al., 2019), así como para analizar el efecto de los mismos sobre la función alterada de otros órganos y tejidos muy dependientes del estado bioenergético como es el cerebro. Además, se requieren una serie de análisis adicionales que permitan identificar las condiciones de

tratamiento óptimas para ver el efecto, bien iniciándolo antes, en ratones de 1-2 meses, o bien en el caso del corazón, mediante el uso de agentes β -adrenérgicos, utilizados como inductores de patología cardíaca (Engelhardt et al., 1999, Oudit et al., 2003) y que serviría para exacerbar este tipo de sintomatología en el ratón AP.

2. Generación y caracterización de la línea celular iPSC PCCB WT-isogénico

La AP es una enfermedad neurometabólica rara que cuenta con un número reducido de modelos animales o celulares, lo que dificulta el estudio de la fisiopatología y el testaje de nuevos tratamientos potenciales. Actualmente, los modelos celulares de los que se dispone mayoritariamente son los fibroblastos procedentes de pacientes, que no constituyen un buen modelo de enfermedad ya que no presentan una alta respiración mitocondrial ni las características celulares propias de los tejidos más afectados como corazón, hígado, cerebro o músculo esquelético. Por ello, es necesario generar nuevos modelos celulares humanos que suplan estas carencias y nos permitan conocer más acerca de los mecanismos moleculares subyacentes a la enfermedad. En este contexto cobran especial relevancia las iPSC, que debido a sus características constituyen una herramienta muy atractiva que permite resolver estos inconvenientes.

Generalmente, las iPSC se producen a partir de precursores diferenciados, como pueden ser fibroblastos obtenidos a partir de biopsias de piel o linfocitos de la sangre. La principal característica de estas células es su pluripotencia, mostrando su capacidad de diferenciación *in vitro* a las tres capas germinales. Así, las iPSC derivadas de pacientes han sido utilizadas para realizar ensayos preclínicos y clínicos de terapia celular, en los que se corrige el defecto mediante recombinación homóloga para a continuación diferenciar las iPSC al linaje correcto y reintroducirlas en el organismo. No obstante, aparte de su potencial terapéutico en medicina regenerativa, la principal aplicación de estas células radica en su uso para el modelado de enfermedades, análisis de terapias y de reposición de fármacos. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de esta aplicación se encuentra en las diferencias existentes entre individuos control y paciente debidas al fondo genético, lo que dificulta la interpretación correcta de los resultados obtenidos. No obstante, el continuo avance en las técnicas de ingeniería genética ha permitido solventar este problema a partir de la generación de los controles isogénicos, que permiten corregir el defecto en una línea celular al mismo tiempo que se mantiene el fondo genético del paciente (Ohnuki, Takahashi, 2015). Previamente en el laboratorio hemos generado de forma exitosa dos líneas de iPSC de pacientes de AP con defectos en los genes *PCCA* (Alonso-Barroso et al., 2017) y *PCCB* (López-Márquez et al., 2019). El paciente PCCB presenta una mutación recurrente (c.1218_1231del14ins12) en homocigosis, lo que lo convierte en un candidato idóneo para la generación del control isogénico.

La tecnología CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ha supuesto un importante avance como herramienta para la edición génica. Este sistema fue originalmente descubierto en bacterias y constituye un mecanismo de defensa frente a infecciones por bacteriófagos, en el que la generación de los denominados CRISPR RNAs (crRNAs) permite dirigir la nucleasa Cas9 contra estos virus, produciendo cortes en su material genético que conducen a su degradación. De esta manera, el diseño de crRNAs específicos nos permite dirigir la nucleasa Cas9 a regiones concretas en el genoma para producir cortes de doble banda que luego son reparados por los mecanismos celulares de unión de extremos no homólogos o recombinación homóloga (Kim, E. J., Kang & Ju, 2017). La aplicación de esta tecnología sobre la línea celular de iPSC del paciente *PCCB* ha permitido corregir eficazmente la mutación, solucionando el problema de la variabilidad entre individuos debida al fondo genético. Este nuevo modelo control permitirá en un futuro poder trasladar a un modelo celular humano los resultados prometedores obtenidos en el modelo murino de AP.

Nuestros resultados confirman que la combinación de la tecnología CRISPR-Cas9 con el uso de iPSC supone una herramienta efectiva de edición génica para la generación de controles isogénicos, sin afectar a las capacidades de pluripotencia de estas células. La generación de este control isogénico y su posterior diferenciación a cardiomiocitos abre la puerta a la posibilidad de realizar nuevos estudios en el futuro que permitan analizar más en profundidad las bases moleculares de la patología a través del estudio del perfil de expresión de cardiomiRs, la función mitocondrial o la homeostasis redox, así como poder testar nuevas aproximaciones terapéuticas.

CONCLUSIONES

1. El análisis molecular, funcional y estructural por ecocardiograma del corazón del modelo murino de AP ha permitido confirmar la presencia de cardiomiopatías asociada a la alteración en las vías de señalización PI3K-AKT y de la ruta de las kinasas de estrés.
2. La identificación en el corazón del modelo murino de AP de cardiomiRs desregulados implicados en vías de remodelado cardiaco ha puesto de manifiesto su implicación en el desarrollo de la sintomatología cardiaca de AP.
3. La presencia de perfiles de cardiomiRs plasmáticos alterados en los pacientes de AP revela su potencial uso como biomarcadores para el seguimiento y monitorización de la sintomatología cardiaca.
4. Los estudios *in vitro* realizados en los cardiomiocitos HL-1 han permitido identificar al propionato como factor desencadenante de la desregulación en los niveles de miRNAs y los marcadores de daño cardiaco BNP y β -MHC, así como de un incremento en la producción de ROS.
5. El tratamiento con bezafibrato, agonista de la familia de factores de transcripción PPAR, en el modelo murino de AP, ha mostrado potencial terapéutico al promover una mejora del metabolismo energético y de la función mitocondrial, así como una recuperación parcial de la homeostasis redox implicada en la fisiopatología de la enfermedad.
6. La tecnología de edición génica mediante CRISPR-Cas9 ha supuesto una herramienta eficaz para corregir una mutación en homocigosis en el gen *PCCB* y así generar un control WT-isogénico a partir de una línea de iPSCs de un paciente con AP, que mantiene el fondo genético de este individuo y las características de células madre.

CONCLUSIONS

1. Molecular, functional and structural analysis by echocardiogram in the heart of the PA mouse model has confirmed the presence of cardiomyopathies associated with the alteration of the PI3K-AKT and the stress kinases signaling pathways.
2. The identification of deregulated cardiomiRs involved in cardiac remodelling in hearts from the PA mice points to their involvement in the development of cardiac alteration in PA.
3. The presence of altered cardiomiRs signature in plasma samples from PA patients reveals their potential use as biomarkers for the follow-up and monitoring of cardiac alterations.
4. *In vitro* analysis using HL-1 cardiomyocytes allowed us to identify propionate as one of the triggers for the deregulation of miRNA levels and cardiac damage markers BNP and β -MHC, as well as for the increase in ROS production.
5. Treating PA mice with bezafibrate, a PPAR pan-agonist, indicates potential therapeutic effects, as it promotes the improvement of energetic metabolism and mitochondrial function, as well as a partial recovery of redox homeostasis, which is involved in PA pathophysiology.
6. CRISPR-Cas9 gene edition technology has proven to be an useful tool to correct the mutations in a *PCCB*-deficient iPS cell model, generating an isogenic WT control that maintains the genetic background and the characteristics of stem cells.

BIBLIOGRAFÍA

- Absalon, S., Kochanek, D.M., Raghavan, V. & Krichevsky, A.M. 2013, "MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 33, no. 37, pp. 14645-14659.
- Aldea, M., Clofent, J., Nunez de Arenas, C., Chamorro, M., Velasco, M., Berrendero, J.R., Navarro, C. & Cuezva, J.M. 2011, "Reverse phase protein microarrays quantify and validate the bioenergetic signature as biomarker in colorectal cancer", *Cancer letters*, vol. 311, no. 2, pp. 210-218.
- 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 research*, vol. 23, pp. 173-177.
- Aoyagi, T. & Matsui, T. 2011, "Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure", *Current pharmaceutical design*, vol. 17, no. 18, pp. 1818-1824.
- Aschrafi, A., Schwechter, A.D., Mameza, M.G., Natera-Naranjo, O., Gioio, A.E. & Kaplan, B.B. 2008, "MicroRNA-338 regulates local cytochrome c oxidase IV mRNA levels and oxidative phosphorylation in the axons of sympathetic neurons", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 28, no. 47, pp. 12581-12590.
- Baumgartner, D., Scholl-Bürgi, S., Sass, J.O., Sperl, W., Schweigmann, U., Stein, J.I. & Karall, D. 2007, "Prolonged QTc intervals and decreased left ventricular contractility in patients with propionic acidemia", *The Journal of pediatrics*, vol. 150, no. 2, pp. 192-7, 197.e1.
- Bayraktar, R., Van Roosbroeck, K. & Calin, G.A. 2017, "Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones", *Molecular oncology*, vol. 11, no. 12, pp. 1673-1686.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E.C. 2007, "Mammalian mirtron genes", *Molecular cell*, vol. 28, no. 2, pp. 328-336.
- Bernardo, B.C., Gao, X.M., Tham, Y.K., Kiriazis, H., Winbanks, C.E., Ooi, J.Y., Boey, E.J., Obad, S., Kauppinen, S., Gregorevic, P., Du, X.J., Lin, R.C. & McMullen, J.R. 2014, "Silencing of miR-34a attenuates cardiac dysfunction in a setting of moderate, but not severe, hypertrophic cardiomyopathy", *PLoS one*, vol. 9, no. 2, pp. e90337.
- Bernardo, B.C., Gao, X.M., Winbanks, C.E., Boey, E.J., Tham, Y.K., Kiriazis, H., Gregorevic, P., Obad, S., Kauppinen, S., Du, X.J., Lin, R.C. & McMullen, J.R. 2012, "Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 43, pp. 17615-17620.
- Bernardo, B.C., Nguyen, S.S., Gao, X.M., Tham, Y.K., Ooi, J.Y., Patterson, N.L., Kiriazis, H., Su, Y., Thomas, C.J., Lin, R.C., Du, X.J. & McMullen, J.R. 2016, "Inhibition of miR-154 Protects Against Cardiac Dysfunction and Fibrosis in a Mouse Model of Pressure Overload", *Scientific reports*, vol. 6, pp. 22442.
- Bernardo, B.C., Ooi, J.Y., Lin, R.C. & McMullen, J.R. 2015, "miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart", *Future medicinal chemistry*, vol. 7, no. 13, pp. 1771-1792.

- Bers, D.M. 2008, "Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes", *Annual Review of Physiology*, vol. 70, pp. 23-49.
- Bers, D.M. 2002, "Cardiac excitation-contraction coupling", *Nature*, vol. 415, no. 6868, pp. 198-205.
- Bilginoglu, A. 2019, "Cardiovascular protective effect of pioglitazone on oxidative stress in rats with metabolic syndrome", *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, vol. 82, no. 6, pp. 452-456.
- Bodi, I., Grãner, S.C., Becker, N., Stoelzle-Feix, S., Spiekerkoetter, U., Zehender, M., Bugger, H., Bode, C. & Odening, K.E. 2016, "Mechanisms of acquired long QT syndrome in patients with propionic academia", *Heart rhythm*, vol. 13, no. 6, pp. 1335-1345.
- Braz, J.C., Bueno, O.F., Liang, Q., Wilkins, B.J., Dai, Y.S., Parsons, S., Braunwart, J., Glascock, B.J., Klevitsky, R., Kimball, T.F., Hewett, T.E. & Molkenin, J.D. 2003, "Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling", *The Journal of clinical investigation*, vol. 111, no. 10, pp. 1475-1486.
- Brieler, J., Breeden, M.A. & Tucker, J. 2017, "Cardiomyopathy: An Overview", *American Family Physician*, vol. 96, no. 10, pp. 640-646.
- Brock, M. & Buckel, W. 2004, "On the mechanism of action of the antifungal agent propionate", *European journal of biochemistry*, vol. 271, no. 15, pp. 3227-3241.
- Calderon-Dominguez, M., Belmonte, T., Quezada-Feijoo, M., Ramos-Sánchez, M., Fernández-Armenta, J., Pérez-Navarro, A., Cesar, S., Peña-Peña, L., Veà, À, Llorente-Cortés, V., Mangas, A., de Gonzalo-Calvo, D. & Toro, R. 2020, "Emerging role of microRNAs in dilated cardiomyopathy: evidence regarding etiology", *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 215, pp. 86-101.
- Callis, T.E., Pandya, K., Seok, H.Y., Tang, R.H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.P., Chen, J.F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M.S., Selzman, C.H. & Wang, D.Z. 2009, "MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice", *The Journal of clinical investigation*, vol. 119, no. 9, pp. 2772-2786.
- Cao, D.D., Li, L. & Chan, W.Y. 2016, "MicroRNAs: Key Regulators in the Central Nervous System and Their Implication in Neurological Diseases", *International journal of molecular sciences*, vol. 17, no. 6, pp. 10.3390/ijms17060842.
- Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., Elia, L., Latronico, M.V., Hoydal, M., Autore, C., Russo, M.A., Dorn, G.W., 2nd, Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K.L., Croce, C.M., Peschle, C. & Condorelli, G. 2007, "MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy", *Nature medicine*, vol. 13, no. 5, pp. 613-618.
- Childs, B., Nyhan, W.L., Borden, M., Bard, L. & Cooke, R.E. 1961, "Idiopathic hyperglycinemia and hyperglycinuria: a new disorder of amino acid metabolism. I", *Pediatrics*, vol. 27, pp. 522-538.
- Condorelli, G., Latronico, M.V. & Cavarretta, E. 2014, "microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 63, no. 21, pp. 2177-2187.
- da 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. & 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, no. 12, pp. 1220-1227.
- D'Angelo, B., Benedetti, E., Cimini, A. & Giordano, A. 2016, "MicroRNAs: A Puzzling Tool in Cancer Diagnostics and Therapy", *Anticancer Research*, vol. 36, no. 11, pp. 5571-5575.
- de Keyzer, Y., Valayannopoulos, V., Benoist, J.F., Batteux, F., Lacaille, F., Hubert, L., Chrétien, D., Chadeaux-Vekemans, B., Niaudet, P., Touati, G., Munnich, A. & de Lonlay, P. 2009, "Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria", *Pediatric research*, vol. 66, no. 1, pp. 91-95.
- de la Bâtie, C.D., Barbier, V., Roda, C., Brassier, A., Arnoux, J.B., Valayannopoulos, V., Guemann, A.S., Pontoizeau, C., Gobin, S., Habarou, F., Lacaille, F., Bonnefont, J.P., Canoui, P., Ottolenghi, C., De Lonlay, P. & Ouss, L. 2018, "Autism spectrum disorders in propionic acidemia patients", *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 41, no. 4, pp. 623-629.
- Desviat, L.R., Perez, B., Perez-Cerda, C., Rodriguez-Pombo, P., Clavero, S. & Ugarte, M. 2004, "Propionic acidemia: mutation update and functional and structural effects of the variant alleles", *Molecular genetics and metabolism*, vol. 83, no. 1-2, pp. 28-37.
- Di Leva, G., Garofalo, M. & Croce, C.M. 2014, "MicroRNAs in cancer", *Annual review of pathology*, vol. 9, pp. 287-314.
- Di, W., Lv, J., Jiang, S., Lu, C., Yang, Z., Ma, Z., Hu, W., Yang, Y. & Xu, B. 2018, "PGC-1: The Energetic Regulator in Cardiac Metabolism", *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 28, pp. 29-46.
- Dionyssiou, M.G., Nowacki, N.B., Hashemi, S., Zhao, J., Kerr, A., Tsushima, R.G. & McDermott, J.C. 2013, "Cross-talk between glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) and p38MAPK regulates myocyte enhancer factor 2 (MEF2) activity in skeletal and cardiac muscle", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 54, pp. 35-44.
- Djouadi, F., Habarou, F., Le Bachelier, C., Ferdinandusse, S., Schlemmer, D., Benoist, J.F., Boutron, A., Andresen, B.S., Visser, G., de Lonlay, P., Olpin, S., Fukao, T., Yamaguchi, S., Strauss, A.W., Wanders, R.J. & Bastin, J. 2016, "Mitochondrial trifunctional protein deficiency in human cultured fibroblasts: effects of bezafibrate", *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 39, no. 1, pp. 47-58.
- Douiev, L., Sheffer, R., Horvath, G. & Saada, A. 2020, "Bezafibrate Improves Mitochondrial Fission and Function in DNMT1L-Deficient Patient Cells", *Cells*, vol. 9, no. 2, pp. 301. doi: 10.3390/cells9020301.
- Duarte, F.V., Palmeira, C.M. & Rolo, A.P. 2014, "The Role of microRNAs in Mitochondria: Small Players Acting Wide", *Genes*, vol. 5, no. 4, pp. 865-886.
- Duras, E., Irdem, A. & Özkaya, O. 2017, "Long QT syndrome diagnosed in two sisters with propionic acidemia: a case report", *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*, vol. 30, no. 10, pp. 1133-1136.
- el Azzouzi, H., Leptidis, S., Dirx, 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., Bourajaj, 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. & 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, no. 3, pp. 341-354.
- El-Hattab, A.W. 2015, "Inborn errors of metabolism", *Clinics in perinatology*, vol. 42, no. 2, pp. 413-39, x.
- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F. & Lohse, M.J. 1999, "Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 12, pp. 7059-7064.
- Esparza-Moltó, P.B. & Cuezva, J.M. 2018, "The Role of Mitochondrial H(+)-ATP Synthase in Cancer", *Frontiers in oncology*, vol. 8, pp. 53.
- Fang, J., Song, X.W., Tian, J., Chen, H.Y., Li, D.F., Wang, J.F., Ren, A.J., Yuan, W.J. & Lin, L. 2012, "Overexpression of microRNA-378 attenuates ischemia-induced apoptosis by inhibiting caspase-3 expression in cardiac myocytes", *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, vol. 17, no. 4, pp. 410-423.
- Feliz, B., Witt, D.R. & Harris, B.T. 2003, "Propionic acidemia: a neuropathology case report and review of prior cases", *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 127, no. 8, pp. e325-8.
- Formentini, L., Sánchez-Aragó, M., Sánchez-Cenizo, L. & Cuezva, J.M. 2012, "The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde pro-survival and proliferative response", *Molecular cell*, vol. 45, no. 6, pp. 731-742.
- Fregeac, J., Colleaux, L. & Nguyen, L.S. 2016, "The emerging roles of MicroRNAs in autism spectrum disorders", *Neuroscience and biobehavioral reviews*, vol. 71, pp. 729-738.
- Fu, C.Y., Chen, J., Lu, X.Y., Zheng, M.Z., Wang, L.L., Shen, Y.L. & Chen, Y.Y. 2019, "Dimethyl fumarate attenuates lipopolysaccharide-induced mitochondrial injury by activating Nrf2 pathway in cardiomyocytes", *Life Sciences*, vol. 235, pp. 116863.
- Gallego-Villar, L., Perez, B., Ugarte, M., Desviat, L.R. & Richard, E. 2014, "Antioxidants successfully reduce ROS production in propionic acidemia fibroblasts", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 452, no. 3, pp. 457-461.
- Gallego-Villar, L., Perez-Cerda, C., Perez, B., Abia, D., Ugarte, M., Richard, E. & Desviat, L.R. 2013, "Functional characterization of novel genotypes and cellular oxidative stress studies in propionic acidemia", *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 36, no. 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. & 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 & medicine*, vol. 96, pp. 1-12.
- Ganesan, J., Ramanujam, D., Sassi, Y., Ahles, A., Jentsch, C., Werfel, S., Leierseder, S., Loyer, X., Giacca, M., Zentilin, L., Thum, T., Lagerbauer, B. & Engelhardt, S. 2013, "MiR-378 controls cardiac hypertrophy by combined repression of

- mitogen-activated protein kinase pathway factors", *Circulation*, vol. 127, no. 21, pp. 2097-2106.
- Ge, Y., Pan, S., Guan, D., Yin, H., Fan, Y., Liu, J., Zhang, S., Zhang, H., Feng, L., Wang, Y., Xu, R. & Yin, J.Q. 2013, "MicroRNA-350 induces pathological heart hypertrophy by repressing both p38 and JNK pathways", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1832, no. 1, pp. 1-10.
- Grueter, C.E., van Rooij, E., Johnson, B.A., DeLeon, S.M., Sutherland, L.B., Qi, X., Gautron, L., Elmquist, J.K., Bassel-Duby, R. & Olson, E.N. 2012, "A cardiac microRNA governs systemic energy homeostasis by regulation of MED13", *Cell*, vol. 149, no. 3, pp. 671-683.
- Guenzel, A.J., Hillestad, M.L., Matern, D. & Barry, M.A. 2014, "Effects of adeno-associated virus serotype and tissue-specific expression on circulating biomarkers of propionic acidemia", *Human Gene Therapy*, vol. 25, no. 9, pp. 837-843.
- Guenzel, A.J., Hofherr, S.E., Hillestad, M., Barry, M., Weaver, E., Venezia, S., Kraus, J.P., Matern, D. & Barry, M.A. 2013, "Generation of a hypomorphic model of propionic acidemia amenable to gene therapy testing", *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 21, no. 7, pp. 1316-1323.
- Gulyaeva, L.F. & Kushlinskiy, N.E. 2016, "Regulatory mechanisms of microRNA expression", *Journal of translational medicine*, vol. 14, no. 1, pp. 143-016-0893-x.
- Gurha, P., Wang, T., Larimore, A.H., Sassi, Y., Abreu-Goodger, C., Ramirez, M.O., Reddy, A.K., Engelhardt, S., Taffet, G.E., Wehrens, X.H., Entman, M.L. & Rodriguez, A. 2013, "microRNA-22 promotes heart failure through coordinate suppression of PPAR/ERR-nuclear hormone receptor transcription", *PloS one*, vol. 8, no. 9, pp. e75882.
- Haijes, H.A., Jans, J.J.M., Tas, S.Y., Verhoeven-Duif, N.M. & van Hasselt, P.M. 2019, "Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 1: Complications", *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 42, no. 5, pp. 730-744.
- Haijes, H.A., van Hasselt, P.M., Jans, J.J.M. & Verhoeven-Duif, N.M. 2019, "Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 2: Treatment strategies", *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 42, no. 5, pp. 745-761.
- Haque, Z.K. & Wang, D.Z. 2017, "How cardiomyocytes sense pathophysiological stresses for cardiac remodeling", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 74, no. 6, pp. 983-1000.
- Harvey, P.A. & Leinwand, L.A. 2011, "The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy", *The Journal of cell biology*, vol. 194, no. 3, pp. 355-365.
- Heineke, J. & Molkentin, J.D. 2006, "Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 7, no. 8, pp. 589-600.
- Hofherr, S.E., Senac, J.S., Chen, C.Y., Palmer, D.J., Ng, P. & Barry, M.A. 2009, "Short-term rescue of neonatal lethality in a mouse model of propionic acidemia by gene therapy", *Human Gene Therapy*, vol. 20, no. 2, pp. 169-180.
- Hong, Y., Cao, H., Wang, Q., Ye, J., Sui, L., Feng, J., Cai, X., Song, H., Zhang, X. & Chen, X. 2016, "MiR-22 may Suppress Fibrogenesis by Targeting TGFbeta R I in Cardiac Fibroblasts", *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology*,

- biochemistry, and pharmacology*, vol. 40, no. 6, pp. 1345-1353.
- Hsia, Y.E., Scully, K.J. & Rosenberg, L.E. 1971, "Inherited propionyl-Coa carboxylase deficiency in "ketotic hyperglycinemia"", *The Journal of clinical investigation*, vol. 50, no. 1, pp. 127-130.
- Huang, C.S., Sadre-Bazzaz, K., Shen, Y., Deng, B., Zhou, Z.H. & Tong, L. 2010, "Crystal structure of the alpha(6)beta(6) holoenzyme of propionyl-coenzyme A carboxylase", *Nature*, vol. 466, no. 7309, pp. 1001-1005.
- Huang, Y., Powers, C., Moore, V., Schafer, C., Ren, M., Phoon, C.K., James, J.F., Glukhov, A.V., Javadov, S., Vaz, F.M., Jefferies, J.L., Strauss, A.W. & Khuchua, Z. 2017, "The PPAR pan-agonist bezafibrate ameliorates cardiomyopathy in a mouse model of Barth syndrome", *Orphanet journal of rare diseases*, vol. 12, no. 1, pp. 49-017-0605-5.
- Huang, Y., Shen, X.J., Zou, Q., Wang, S.P., Tang, S.M. & Zhang, G.Z. 2011, "Biological functions of microRNAs: a review", *Journal of physiology and biochemistry*, vol. 67, no. 1, pp. 129-139.
- Huang, Z.P., Chen, J., Seok, H.Y., Zhang, Z., Kataoka, M., Hu, X. & Wang, D.Z. 2013, "MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress", *Circulation research*, vol. 112, no. 9, pp. 1234-1243.
- Huntzinger, E. & Izaurralde, E. 2011, "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay", *Nature reviews.Genetics*, vol. 12, no. 2, pp. 99-110.
- Ikeda, S., He, A., Kong, S.W., Lu, J., Bejar, R., Bodyak, N., Lee, K.H., Ma, Q., Kang, P.M., Golub, T.R. & Pu, W.T. 2009, "MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes", *Molecular and cellular biology*, vol. 29, no. 8, pp. 2193-2204.
- Jayadev, S., Case, A., Alajajian, B., Eastman, A.J., Möller, T. & Garden, G.A. 2013, "Presenilin 2 influences miR146 level and activity in microglia", *Journal of neurochemistry*, vol. 127, no. 5, pp. 592-599.
- Johri, A., Calingasan, N.Y., Hennessey, T.M., Sharma, A., Yang, L., Wille, E., Chandra, A. & Beal, M.F. 2012, "Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease", *Human molecular genetics*, vol. 21, no. 5, pp. 1124-1137.
- Jonas, S. & Izaurralde, E. 2015, "Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing", *Nature reviews.Genetics*, vol. 16, no. 7, pp. 421-433.
- Joshi, A.U. & Mochly-Rosen, D. 2018, "Mortal engines: Mitochondrial bioenergetics and dysfunction in neurodegenerative diseases", *Pharmacological research*, vol. 138, pp. 2-15.
- Kaese, S. & Verheule, S. 2012, "Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size", *Frontiers in physiology*, vol. 3, pp. 345.
- Kebede, A.F., Nieborak, A., Shahidian, L.Z., Le Gras, S., Richter, F., Gómez, D.A., Baltissen, M.P., Meszaros, G., Magliarelli, H.F., Taudt, A., Margueron, R., Colomé-Tatché, M., Ricci, R., Daujat, S., Vermeulen, M., Mittler, G. & Schneider, R. 2017, "Histone propionylation is a mark of active chromatin", *Nature structural & molecular biology*, vol. 24, no. 12, pp. 1048-1056.
- Kim, E.J., Kang, K.H. & Ju, J.H. 2017, "CRISPR-Cas9: a promising tool for gene editing on induced pluripotent stem cells", *The*

- Korean journal of internal medicine*, vol. 32, no. 1, pp. 42-61.
- Kim, V.N., Han, J. & Siomi, M.C. 2009, "Biogenesis of small RNAs in animals", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 10, no. 2, pp. 126-139.
- Kovacevic, A., Garbade, S.F., Hoffmann, G.F., Gorenflo, M., Kölker, S. & Staufner, C. 2020, "Cardiac phenotype in propionic acidemia - Results of an observational monocentric study", *Molecular genetics and metabolism*, vol. 130, no. 1, pp. 41-48.
- Laemmle, A., Balmer, C., Doell, C., Sass, J.O., Häberle, J. & Baumgartner, M.R. 2014, "Propionic acidemia in a previously healthy adolescent with acute onset of dilated cardiomyopathy", *European journal of pediatrics*, vol. 173, no. 7, pp. 971-974.
- Lam Hon Wah, A.M., Lam, K.F., Tsui, F., Robinson, B., Saunders, M.E. & Gravel, R.A. 1983, "Assignment of the alpha and beta chains of human propionyl-CoA carboxylase to genetic complementation groups", *American Journal of Human Genetics*, vol. 35, no. 5, pp. 889-899.
- Lee, A. & Pickham, D. 2016, "Basic Cardiac Electrophysiology and Common Drug-induced Arrhythmias", *Critical Care Nursing Clinics of North America*, vol. 28, no. 3, pp. 357-371.
- Lesnefsky, E.J., Chen, Q. & Hoppel, C.L. 2016, "Mitochondrial Metabolism in Aging Heart", *Circulation research*, vol. 118, no. 10, pp. 1593-1611.
- Li, C., Li, X., Gao, X., Zhang, R., Zhang, Y., Liang, H., Xu, C., Du, W., Zhang, Y., Liu, X., Ma, N., Xu, Z., Wang, L., Chen, X., Lu, Y., Ju, J., Yang, B. & Shan, H. 2014, "MicroRNA-328 as a regulator of cardiac hypertrophy", *International journal of cardiology*, vol. 173, no. 2, pp. 268-276.
- Li, J., Donath, S., Li, Y., Qin, D., Prabhakar, B.S. & Li, P. 2010, "miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway", *PLoS genetics*, vol. 6, no. 1, pp. e1000795.
- Li, N., Zhou, H. & Tang, Q. 2018, "miR-133: A Suppressor of Cardiac Remodeling?", *Frontiers in pharmacology*, vol. 9, pp. 903.
- 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. & Yang, X. 2017, "miR-199a impairs autophagy and induces cardiac hypertrophy through mTOR activation", *Cell death and differentiation*, vol. 24, no. 7, pp. 1205-1213.
- Liang, Q., Bueno, O.F., Wilkins, B.J., Kuan, C.Y., Xia, Y. & Molkentin, J.D. 2003, "c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling", *The EMBO journal*, vol. 22, no. 19, pp. 5079-5089.
- Lin, Z., Murtaza, I., Wang, K., Jiao, J., Gao, J. & Li, P.F. 2009, "miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 29, pp. 12103-12108.
- Liu, A., Sun, Y. & Yu, B. 2018, "MicroRNA-208a Correlates Apoptosis and Oxidative Stress Induced by H₂O₂ through Protein Tyrosine Kinase/Phosphatase Balance in Cardiomyocytes", *International heart journal*, vol. 59, no. 4, pp. 829-836.
- Longo, N., Price, L.B., Gappmaier, E., Cantor, N.L., Ernst, S.L., Bailey, C. & Pasquali, M. 2017, "Anaplerotic therapy in propionic acidemia", *Molecular genetics and metabolism*, vol. 122, no. 1-2, pp. 51-59.
- López-Márquez, A., Alonso-Barroso, E., Cerro-Tello, G., Bravo-Alonso, I., Arribas-

- Carreira, L., Briso-Montiano, Á, Navarrete, R., Pérez-Cerdá, C., Ugarte, M., Pérez, B., Desviat, L.R. & 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.
- M**akarova, J.A., Shkurnikov, M.U., Turchinovich, A.A., Tonevitsky, A.G. & Grigoriev, A.I. 2015, "Circulating microRNAs", *Biochemistry.Biokhimiia*, vol. 80, no. 9, pp. 1117-1126.
- Marín-García, J. & Akhmedov, A.T. 2016, "Mitochondrial dynamics and cell death in heart failure", *Heart failure reviews*, vol. 21, no. 2, pp. 123-136.
- Matkovich, S.J., Hu, Y., Eschenbacher, W.H., Dorn, L.E. & Dorn, G.W., 2nd 2012, "Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy", *Circulation research*, vol. 111, no. 5, pp. 521-531.
- McKenna, W.J., Maron, B.J. & Thiene, G. 2017, "Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies", *Circulation research*, vol. 121, no. 7, pp. 722-730.
- Mersey, B.D., Jin, P. & Danner, D.J. 2005, "Human microRNA (miR29b) expression controls the amount of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in a cell", *Human molecular genetics*, vol. 14, no. 22, pp. 3371-3377.
- Minones-Moyano, E., Porta, S., Escaramis, G., Rabionet, R., Iraola, S., Kagerbauer, B., Espinosa-Parrilla, Y., Ferrer, I., Estivill, X. & Martí, E. 2011, "MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function", *Human molecular genetics*, vol. 20, no. 15, pp. 3067-3078.
- 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. & 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, no. 38, pp. 35995-35999.
- Modesto, K. & Sengupta, P.P. 2014, "Myocardial mechanics in cardiomyopathies", *Progress in cardiovascular diseases*, vol. 57, no. 1, pp. 111-124.
- Mohrmann, D.E. 2007, *Fisiología cardiovascular*, 6^º ed. edn, Méxicoetc.]:McGraw Hill, Méxicoetc.
- Molkentin, J.D. 2004, "Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs", *Cardiovascular research*, vol. 63, no. 3, pp. 467-475.
- Montgomery, R.L., Hullinger, T.G., Semus, H.M., Dickinson, B.A., Seto, A.G., Lynch, J.M., Stack, C., Latimer, P.A., Olson, E.N. & van Rooij, E. 2011, "Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure", *Circulation*, vol. 124, no. 14, pp. 1537-1547.
- Montgomery, R.L., Yu, G., Latimer, P.A., Stack, C., Robinson, K., Dalby, C.M., Kaminski, N. & van Rooij, E. 2014, "MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis", *EMBO molecular medicine*, vol. 6, no. 10, pp. 1347-1356.
- Moran, C.M., Thomson, A.J., Rog-Zielinska, E. & Gray, G.A. 2013, "High-resolution echocardiography in the assessment of cardiac physiology and disease in preclinical models", *Experimental physiology*, vol. 98, no. 3, pp. 629-644.

- Morava, E., Rahman, S., Peters, V., Baumgartner, M.R., Patterson, M. & Zschocke, J. 2015, "Quo vadis: the re-definition of "inborn metabolic diseases"", *Journal of inherited metabolic disease*, vol. 38, no. 6, pp. 1003-1006.
- Mushtaq, G., Greig, N.H., Anwar, F., Zamzami, M.A., Choudhry, H., Shaik, M.M., Tamargo, I.A. & Kamal, M.A. 2016, "miRNAs as Circulating Biomarkers for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease", *Medicinal chemistry (Shariqah (United Arab Emirates))*, vol. 12, no. 3, pp. 217-225.
- N**agao, M., Tanaka, T., Morii, M., Wakai, S., Horikawa, R. & Kasahara, M. 2013, "Improved neurologic prognosis for a patient with propionic acidemia who received early living donor liver transplantation", *Molecular genetics and metabolism*, vol. 108, no. 1, pp. 25-29.
- Nguyen, N.H., Morland, C., Gonzalez, S.V., Rise, F., Storm-Mathisen, J., Gundersen, V. & Hassel, B. 2007, "Propionate increases neuronal histone acetylation, but is metabolized oxidatively by glia. Relevance for propionic acidemia", *Journal of neurochemistry*, vol. 101, no. 3, pp. 806-814.
- Nishikimi, T., Maeda, N. & Matsuoka, H. 2006, "The role of natriuretic peptides in cardioprotection", *Cardiovascular research*, vol. 69, no. 2, pp. 318-328.
- O**hnuki, M. & Takahashi, K. 2015, "Present and future challenges of induced pluripotent stem cells", *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, vol. 370, no. 1680, pp. 20140367.
- Oliveira-Carvalho, V., Carvalho, V.O. & Bocchi, E.A. 2013, "The emerging role of miR-208a in the heart", *DNA and cell biology*, vol. 32, no. 1, pp. 8-12.
- Orenes-Pinero, E., Montoro-Garcia, S., Patel, J.V., Valdes, M., Marin, F. & Lip, G.Y. 2013, "Role of microRNAs in cardiac remodelling: new insights and future perspectives", *International journal of cardiology*, vol. 167, no. 5, pp. 1651-1659.
- Oudit, G.Y., Crackower, M.A., Eriksson, U., Sarao, R., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Gidrewicz, D., Rybin, V.O., Wada, T., Steinberg, S.F., Backx, P.H. & Penninger, J.M. 2003, "Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure", *Circulation*, vol. 108, no. 17, pp. 2147-2152.
- Ozsait, B., Komurcu-Bayrak, E., Levula, M., Erginel-Unaltuna, N., Kähönen, M., Rai, M., Lehtimäki, T. & Laaksonen, R. 2010, "Niemann-Pick type C fibroblasts have a distinct microRNA profile related to lipid metabolism and certain cellular components", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 403, no. 3-4, pp. 316-321.
- P**an, L., Huang, B.J., Ma, X.E., Wang, S.Y., Feng, J., Lv, F., Liu, Y., Liu, Y., Li, C.M., Liang, D.D., Li, J., Xu, L. & Chen, Y.H. 2015, "MiR-25 protects cardiomyocytes against oxidative damage by targeting the mitochondrial calcium uniporter", *International journal of molecular sciences*, vol. 16, no. 3, pp. 5420-5433.
- 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. & Summar, M.L. 2012, "Natural history of propionic acidemia", *Molecular genetics and metabolism*, vol. 105, no. 1, pp. 5-9.
- R**ichard, E., Pérez, B., Pérez-Cerdá, C. & Desviat, L.R. 2015, "Understanding molecular mechanisms in propionic acidemia and investigated therapeutic

- strategies", *Expert Opinion on Orphan Drugs*, vol. 3, no. 12, pp. 1427-1438.
- Riemersma, M., Hazebroek, M.R., Helderma-van den Enden, A.T.J.M., Salomons, G.S., Ferdinandusse, S., Brouwers, M.C.G.J., van der Ploeg, L., Heymans, S., Glatz, J.F.C., van den Wijngaard, A., Krapels, I.P.C., Bierau, J. & Brunner, H.G. 2017, "Propionic acidemia as a cause of adult-onset dilated cardiomyopathy", *European journal of human genetics : EJHG*, vol. 25, no. 11, pp. 1195-1201.
- Rivera-Barahona, A., Alonso-Barroso, E., Perez, B., Murphy, M.P., Richard, E. & 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.
- Rivera-Barahona, A., Navarrete, R., García-Rodríguez, R., Richard, E., Ugarte, M., Pérez-Cerda, C., Pérez, B., Gómez, A. & Desviat, L.R. 2018, "Identification of 34 novel mutations in propionic acidemia: Functional characterization of missense variants and phenotype associations", *Molecular genetics and metabolism*, vol. 125, no. 3, pp. 266-275.
- Roberts, T.C., Blomberg, K.E., McClorey, G., El Andaloussi, S., Godfrey, C., Betts, C., Coursindel, T., Gait, M.J., Smith, C.I. & Wood, M.J. 2012, "Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the microRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy", *Molecular therapy.Nucleic acids*, vol. 1, no. 8, pp. e39.
- Romano, S., Valayannopoulos, V., Touati, G., Jais, J.P., Rabier, D., de Keyser, Y., Bonnet, D. & de Lonlay, P. 2010, "Cardiomyopathies in propionic aciduria are reversible after liver transplantation", *The Journal of pediatrics*, vol. 156, no. 1, pp. 128-134.
- Roncarati, R., Viviani Anselmi, C., Losi, M.A., Papa, L., Cavarretta, E., Da Costa Martins, P., Contaldi, C., Saccani Jotti, G., Franzone, A., Galastri, L., Latronico, M.V., Imbriaco, M., Esposito, G., De Windt, L., Betocchi, S. & Condorelli, G. 2014, "Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy", *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 63, no. 9, pp. 920-927.
- Sabir, I.N., Killeen, M.J., Grace, A.A. & Huang, C.L. 2008, "Ventricular arrhythmogenesis: insights from murine models", *Progress in biophysics and molecular biology*, vol. 98, no. 2-3, pp. 208-218.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, no. 12, pp. 5463-5467.
- Santacatterina, F., Chamorro, M., de Arenas, C.N., Navarro, C., Martin, M.A., Cuezva, J.M. & Sanchez-Arago, M. 2015, "Quantitative analysis of proteins of metabolism by reverse phase protein microarrays identifies potential biomarkers of rare neuromuscular diseases", *Journal of translational medicine*, vol. 13, pp. 65-015-0424-1.
- Santacatterina, F., Torresano, L., Nunez-Salgado, A., Esparza-Molto, P.B., Olive, M., Gallardo, E., Garcia-Arumi, E., Blazquez, A., Gonzalez-Quintana, A., Martin, M.A. & Cuezva, J.M. 2018, "Different mitochondrial genetic defects exhibit the same protein signature of metabolism in skeletal muscle of PEO and MELAS patients: A role for oxidative stress", *Free radical biology & medicine*, vol. 126, pp. 235-248.

- Satoh, M., Minami, Y., Takahashi, Y., Tabuchi, T. & Nakamura, M. 2010, "Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy", *Journal of cardiac failure*, vol. 16, no. 5, pp. 404-410.
- Schafer, C., Moore, V., Dasgupta, N., Javadov, S., James, J.F., Glukhov, A.I., Strauss, A.W. & Khuchua, Z. 2018, "The Effects of PPAR Stimulation on Cardiac Metabolic Pathways in Barth Syndrome Mice", *Frontiers in pharmacology*, vol. 9, pp. 318.
- Schnelle, M., Catibog, N., Zhang, M., Nabeebaccus, A.A., Anderson, G., Richards, D.A., Sawyer, G., Zhang, X., Toischer, K., Hasenfuss, G., Monaghan, M.J. & Shah, A.M. 2018, "Echocardiographic evaluation of diastolic function in mouse models of heart disease", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 114, pp. 20-28.
- Schreiber, J., Chapman, K.A., Summar, M.L., Ah Mew, N., Sutton, V.R., MacLeod, E., Stagni, K., Ueda, K., Franks, J., Island, E., Matern, D., Peña, L., Smith, B., Urv, T., Venditti, C., Chakarapani, A. & Gropman, A.L. 2012, "Neurologic considerations in propionic acidemia", *Molecular genetics and metabolism*, vol. 105, no. 1, pp. 10-15.
- Schwab, M.A., Sauer, S.W., Okun, J.G., Nijtmans, L.G., Rodenburg, R.J., van den Heuvel, L.P., Dröse, S., Brandt, U., Hoffmann, G.F., Ter Laak, H., Kölker, S. & Smeitink, J.A. 2006, "Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins", *The Biochemical journal*, vol. 398, no. 1, pp. 107-112.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. & Zamore, P.D. 2003, "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex", *Cell*, vol. 115, no. 2, pp. 199-208.
- Sheinerman, K.S., Toledo, J.B., Tsvinsky, V.G., Irwin, D., Grossman, M., Weintraub, D., Hurtig, H.I., Chen-Plotkin, A., Wolk, D.A., McCluskey, L.F., Elman, L.B., Trojanowski, J.Q. & Umansky, S.R. 2017, "Circulating brain-enriched microRNAs as novel biomarkers for detection and differentiation of neurodegenerative diseases", *Alzheimer's research & therapy*, vol. 9, no. 1, pp. 89-017-0316-0.
- Singh, M., Morin, D.P. & Link, M.S. 2019, "Sudden cardiac death in Long QT syndrome (LQTS), Brugada syndrome, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)", *Progress in cardiovascular diseases*, vol. 62, no. 3, pp. 227-234.
- Sisakian, H. 2014, "Cardiomyopathies: Evolution of pathogenesis concepts and potential for new therapies", *World journal of cardiology*, vol. 6, no. 6, pp. 478-494.
- Sohel, M.M.H. 2020, "Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis", *Life Sciences*, vol. 248, pp. 117473.
- Sweeney, H.L. & Hammers, D.W. 2018, "Muscle Contraction", *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 10, no. 2, pp. a023200. doi: 10.1101/cshperspect.a023200.
- Tétreault, N. & De Guire, V. 2013, "miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action", *Clinical biochemistry*, vol. 46, no. 10-11, pp. 842-845.
- Tamayo, M., Fulgencio-Covian, A., Navarro-García, J.A., Val-Blasco, A., Ruiz-Hurtado, G., Gil-Fernandez, M., Martín-Nunes, L., Lopez, J.A., Desviat, L.R., Delgado, C., Richard, E. & 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, no. 1, pp. 165586.
- Tang, Y., Zheng, J., Sun, Y., Wu, Z., Liu, Z. & Huang, G. 2009, "MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2", *International heart journal*, vol. 50, no. 3, pp. 377-387.
- Tham, Y.K., Bernardo, B.C., Ooi, J.Y., Weeks, K.L. & McMullen, J.R. 2015, "Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets", *Archives of Toxicology*, vol. 89, no. 9, pp. 1401-1438.
- Toro, R., Blasco-Turrión, S., Morales-Ponce, F.J., Gonzalez, P., Martínez-Cambor, P., López-Granados, A., Brugada, R., Campuzano, O., Pérez-Serra, A., Rosa Longobardo, F., Mangas, A., Llorente-Cortes, V. & de Gonzalo-Calvo, D. 2018, "Plasma microRNAs as biomarkers for Lamin A/C-related dilated cardiomyopathy", *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, vol. 96, no. 8, pp. 845-856.
- U**garte, M., Perez-Cerda, C., Rodriguez-Pombo, P., Desviat, L.R., Perez, B., Richard, E., Muro, S., Campeau, E., Ohura, T. & Gravel, R.A. 1999, "Overview of mutations in the PCCA and PCCB genes causing propionic acidemia", *Human mutation*, vol. 14, no. 4, pp. 275-282.
- V**al-Blasco, A., Navarro-Garcia, J.A., Tamayo, M., Piedras, M.J., Prieto, P., Delgado, C., Ruiz-Hurtado, G., Rozas-Romero, L., Gil-Fernandez, M., Zaragoza, C., Bosca, L. & Fernandez-Velasco, M. 2018, "Deficiency of NOD1 Improves the beta-Adrenergic Modulation of Ca(2+) Handling in a Mouse Model of Heart Failure", *Frontiers in physiology*, vol. 9, pp. 702.
- van Berlo, J.H., Maillet, M. & Molkentin, J.D. 2013, "Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart", *The Journal of clinical investigation*, vol. 123, no. 1, pp. 37-45.
- van Rooij, E. & Kauppinen, S. 2014, "Development of microRNA therapeutics is coming of age", *EMBO molecular medicine*, vol. 6, no. 7, pp. 851-864.
- van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B.A., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Kelm, R.J., Jr & Olson, E.N. 2009, "A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance", *Developmental cell*, vol. 17, no. 5, pp. 662-673.
- van Rooij, E., Sutherland, L.B., Liu, N., Williams, A.H., McAnally, J., Gerard, R.D., Richardson, J.A. & Olson, E.N. 2006, "A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 48, pp. 18255-18260.
- van Rooij, E., Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J.A. & Olson, E.N. 2008, "Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 35, pp. 13027-13032.
- Vienberg, S., Geiger, J., Madsen, S. & Dalgaard, L.T. 2017, "MicroRNAs in metabolism", *Acta physiologica (Oxford, England)*, vol. 219, no. 2, pp. 346-361.
- W**ang, B.W., Wu, G.J., Cheng, W.P. & Shyu, K.G. 2014, "MicroRNA-208a increases myocardial fibrosis via endoglin in

- volume overloading heart", *PLoS one*, vol. 9, no. 1, pp. e84188.
- Wang, G.K., Zhu, J.Q., Zhang, J.T., Li, Q., Li, Y., He, J., Qin, Y.W. & Jing, Q. 2010, "Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans", *European heart journal*, vol. 31, no. 6, pp. 659-666.
- Wang, H. & Cai, J. 2017, "The role of microRNAs in heart failure", *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, vol. 1863, no. 8, pp. 2019-2030.
- Wang, J., Liew, O.W., Richards, A.M. & Chen, Y.T. 2016, "Overview of MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Apoptosis", *International journal of molecular sciences*, vol. 17, no. 5, pp. 10.3390/ijms17050749.
- Wang, J.X., Jiao, J.Q., Li, Q., Long, B., Wang, K., Liu, J.P., Li, Y.R. & Li, P.F. 2011, "miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1", *Nature medicine*, vol. 17, no. 1, pp. 71-78.
- Wang, K., Lin, Z.Q., Long, B., Li, J.H., Zhou, J. & Li, P.F. 2012, "Cardiac hypertrophy is positively regulated by MicroRNA miR-23a", *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, no. 1, pp. 589-599.
- Wang, L., Li, X., Zhou, Y., Shi, H., Xu, C., He, H., Wang, S., Xiong, X., Zhang, Y., Du, Z., Zhang, R., Lu, Y., Yang, B. & Shan, H. 2014, "Downregulation of miR-133 via MAPK/ERK signaling pathway involved in nicotine-induced cardiomyocyte apoptosis", *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, vol. 387, no. 2, pp. 197-206.
- Xu, X.D., Song, X.W., Li, Q., Wang, G.K., Jing, Q. & Qin, Y.W. 2012, "Attenuation of microRNA-22 derepressed PTEN to effectively protect rat cardiomyocytes from hypertrophy", *Journal of cellular physiology*, vol. 227, no. 4, pp. 1391-1398.
- Yasuno, T., Osafune, K., Sakurai, H., Asaka, I., Tanaka, A., Yamaguchi, S., Yamada, K., Hitomi, H., Arai, S., Kurose, Y., Higaki, Y., Sudo, M., Ando, S., Nakashima, H., Saito, T. & Kaneoka, H. 2014, "Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 448, no. 2, pp. 175-181.
- Zhao, Q.D., Viswanadhapalli, S., Williams, P., Shi, Q., Tan, C., Yi, X., Bhandari, B. & Abboud, H.E. 2015, "NADPH oxidase 4 induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NFκB signaling pathways", *Circulation*, vol. 131, no. 7, pp. 643-655.
- Zhao, Y., Ransom, J.F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A.N., Tsuchihashi, T., McManus, M.T., Schwartz, R.J. & Srivastava, D. 2007, "Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2", *Cell*, vol. 129, no. 2, pp. 303-317.
- Zhou, B. & Tian, R. 2018, "Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure", *The Journal of clinical investigation*, vol. 128, no. 9, pp. 3716-3726.
- Zima, A.V. & Blatter, L.A. 2006, "Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters", *Cardiovascular research*, vol. 71, no. 2, pp. 310-321.

PUBLICACIONES

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

- Rivera-Barahona, A., **Fulgencio-Covian, A.**, Perez-Cerda, C., Ramos, R., Barry, M.A., Ugarte, M., Perez, B., Richard, E. & Desviat, L.R. 2017, "Dysregulated miRNAs and their pathogenic implications for the neurometabolic disease propionic acidemia", *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, pp. 5727-017-06420-8.
- 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. & 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, no. 1, pp. 165586.
- Fulgencio-Covian, A.**, Alonso-Barroso, E., Guenzel, A.J., Rivera-Barahona, A., Ugarte, M., Perez, B., Barry, M.A., Perez-Cerda, C., Richard, E. & 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.
- Fulgencio-Covián, A.**, Álvarez, M., Pepers, B.A., López-Márquez, A., Ugarte, M., Pérez, B., van Roon-Mom, W.M.C., Desviat, L.R. & Richard, E. 2020, "Generation of a gene-corrected human isogenic line (UAMi006-A) from propionic acidemia patient iPSC with an homozygous mutation in the PCCB gene using CRISPR/Cas9 technology", *Stem Cell Research*, , pp. 102055.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Dysregulated miRNAs and their pathogenic implications for the neurometabolic disease propionic acidemia

Ana Rivera-Barahona^{1,2,3,4}, Alejandro Fulgencio-Covián^{1,2,3,4}, Celia Pérez-Cerdá^{2,3,4}, Ricardo Ramos⁵, Michael A. Barry⁶, Magdalena Ugarte^{2,3,4}, Belén Pérez^{1,2,3,4}, Eva Richard^{1,2,3,4} & Lourdes R Desviat^{1,2,3,4}

miRNome expression profiling was performed in a mouse model of propionic acidemia (PA) and in patients' plasma samples to investigate the role of miRNAs in the pathophysiology of the disease and to identify novel biomarkers and therapeutic targets. PA is a potentially lethal neurometabolic disease with patients developing neurological deficits and cardiomyopathy in the long-term, among other complications. In the PA mouse liver we identified 14 significantly dysregulated miRNAs. Three selected miRNAs, miR-34a-5p, miR-338-3p and miR-350, were found upregulated in brain and heart tissues. Predicted targets involved in apoptosis, stress-signaling and mitochondrial function, were inversely found down-regulated. Functional analysis with miRNA mimics in cellular models confirmed these findings. miRNA profiling in plasma samples from neonatal PA patients and age-matched control individuals identified a set of differentially expressed miRNAs, several were coincident with those identified in the PA mouse, among them miR-34a-5p and miR-338-3p. These two miRNAs were also found dysregulated in childhood and adult PA patients' cohorts. Taken together, the results reveal miRNA signatures in PA useful to identify potential biomarkers, to refine the understanding of the molecular mechanisms of this rare disease and, eventually, to improve the management of patients.

microRNAs (miRNAs) are essential players in gene expression regulation. They are non-coding single-stranded RNAs of 20–24 nucleotides in length that act post-transcriptionally by base-pairing with the 3' untranslated regions of target mRNAs. Typically, an 8-mer “seed” sequence located in the 5' end of miRNAs directs the recognition of target mRNA and, consequently, gene silencing by degradation or translational repression, depending on whether the complementarity between miRNA and target mRNA sequence is perfect or not^{1,2}. In some cases alternative modes of miRNA target recognition have been described, including G-bulge sites³, imperfect centered sites⁴ or sites centering on miRNA nucleotides 13–16 that compensate for seed mismatches or that supplement the seed region⁵. A single miRNA may control the expression of multiple targets and a particular mRNA can be targeted by several miRNAs, thus establishing miRNAs networks that govern many biological processes including cell differentiation, proliferation, cell death and metabolic control. Thereby, miRNA dysregulation may have a broad impact on cellular physiology contributing to disease development. In fact, alterations in miRNA function have been reported in many human disorders such as cancer⁶, cardiovascular⁷ and neurodegenerative diseases^{8,9}. One of the most exciting developments in the field of miRNA research involves the efficient manipulation of miRNA function using antisense oligonucleotides acting as miRNA inhibitors or antagonists (antagomirs) or synthetic miRNAs (miRNA mimics) for restoring normal levels of a miRNA associated to a disease state. To date, there is a large interest in the potential of this approach which has already entered the clinical phase¹⁰.

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC, Universidad Autónoma, Madrid, Spain. ²Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), Madrid, Spain. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain. ⁴Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Paz (IdiPaz), ISCIII, Madrid, Spain. ⁵Genomic Facility, Parque Científico de Madrid, Madrid, Spain. ⁶Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.R.D. (email: lruiz@cbm.csic.es)

Received: 2 March 2017

Accepted: 13 June 2017

Published online: 18 July 2017

In the past few years, the discovery of the stable presence of miRNAs in body fluids in relation to disease has opened new clinical avenues for miRNAs as diagnostic tools¹¹. Circulating miRNAs can originate from damaged cells due to passive leakage or can be actively secreted packaged in exosomes or microvesicles, or conjugated with proteins. Subsequently, they can be taken up by new cells where they can potentially regulate gene expression thus acting as extracellular messengers^{12–16}. In clinical settings, the use of circulating miRNAs as minimal invasive biomarkers for diagnosis, prognosis or treatment monitoring has been explored mainly for cancer and cardiovascular diseases¹⁷.

Recent evidence shows that miRNAs play a role in mitochondrial dysfunction, apoptosis and oxidative stress^{18,19}, which contribute to the pathogenesis of many human disorders, including inherited metabolic diseases (IMD)^{20–22}. All IMD are classified as rare diseases due to their low individual prevalence and most of them do not currently have an effective treatment. Among them, propionic acidemia (PA, MIM#606054) is one of the most frequent, life-threatening organic acidemias, with an incidence of 1 in 100,000 live births, and caused by mutations in either the *PCCA* or *PCCB* genes, encoding both subunits of the mitochondrial propionyl-CoA carboxylase (PCC, E.C.6.4.1.3) enzyme. PCC catalyzes the carboxylation of propionyl-CoA, derived from the catabolism of several amino acids, cholesterol side chain and odd-chain fatty acids, to D-methylmalonyl-CoA, which eventually enters the Krebs cycle²³. *In vivo* and *in vitro* evidence points to the pathogenic role of a secondary mitochondrial dysfunction induced by accumulated toxic metabolites resulting in cellular oxidative damage^{24,25}.

Clinical picture in PA varies from a neonatal toxic encephalopathy to milder later forms with diverse neurological or cardiac symptoms with or without episodes of metabolic decompensation. Advances in supportive treatment based on dietary restriction and carnitine supplementation have allowed patients to live beyond the neonatal period. However, natural progression of PA leads to a multisystemic disorder of gastrointestinal, immune, nervous and cardiovascular system^{26,27}. To date, there is an unmet clinical need to develop novel therapeutic approaches. At present, there is limited understanding of the mechanisms by which PCC deficiency produces multiorgan complications, including the most frequent hypertrophic cardiomyopathy and basal ganglia deterioration, which are primarily responsible for the high morbidity and mortality.

In this study we have investigated the miRNA expression profile in tissue samples from the hypomorphic mouse model of PA *Pcca*^{-/-} (A138T)²⁸ and the correlation with specific target genes' expression. In parallel, we have investigated the circulating miRNA profile in PA patients' plasma samples. The results provide fundamental new insights into miRNA-mediated altered cellular processes potentially contributing to PA pathogenesis and warrant further studies of circulating miRNAs as PA disease biomarkers.

Results

Altered miRNA expression in liver of PA mice. As a starting point, we performed miRNA profiling in liver tissue of *Pcca*^{-/-} (A138T) (PA) mice in which we had previously detected an altered bioenergetic and redox profile potentially contributing to the pathophysiology of the disease²⁵. The analysis was performed by qRT-PCR with PA and wild-type (wt) mice samples (2 months-old, n = 4 per group) using PCR panels with pre-aliquoted primers for 752 miRNAs. We detected 286 target miRNAs with Ct values <35, with 14 miRNAs showing significant differential expression (Fig. 1). Four miRNAs were significantly downregulated (RQ 0.17–0.5) and 10 were upregulated (RQ 1.7–4.5) (Table 1).

Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of the miRNA profiling data showed several overrepresented biological functions including cell-to-cell signaling and interaction, cellular proliferation and cellular development. The top enriched functions in pathological processes include cardiac hypertrophy, liver damage and renal necrosis. We performed *in silico* analysis of predicted and validated targets of the dysregulated miRNAs using different bioinformatic tools and databases (miRBase TargetScan, MiRTarBase), as well as a review of published studies including analyzed targets and pathways involved in disease processes for each miRNA. We and other authors have reported that mitochondrial dysfunction and oxidative stress are probable key players in the pathophysiology of PA^{24,25}, which led us to select three miRNAs for further studies, miR-34a-5p, miR-338-3p and miR-350, due to their involvement in these processes. miR-34a-5p targets *Bcl2*, *Sirt1* and *Notch1* genes, influencing apoptosis and mitochondrial energy metabolism, among other processes^{29,30}; miR-338-3p regulates the expression of several subunits of mitochondrial oxidative phosphorylation complexes³¹, and miR-350 regulates p38 and JNK stress kinases³².

miR-34a-5p, miR-338-3p and miR-350 are up-regulated in different tissues of PA mice. Natural history of PA indicates that neurological and cardiac complications are frequent^{26,27}. The hypomorphic PA mouse model used in this study accurately recapitulates biochemical and clinical biomarkers similar to those in patients with PA. Elevated brain natriuretic peptide (BNP), a biomarker for cardiomyopathy and cardiac dysfunction, and increased heart size was reported in this mouse model²⁸. We re-examined the expression of BNP as well as of other cardiac hypertrophy markers (ANP and β -MHC) in PA mice and confirmed that the three are upregulated (2–3 fold increase) in heart samples from 5 months-old mice (Supplementary Fig. 1). Neurological evaluation of the *Pcca*^{-/-} (A138T) mice has not been described. Preliminary behavior and locomotive studies performed in our lab indicate the existence of a mild age-dependent deficit in locomotion and motor coordination (unpublished observations).

To gain insight into the possible role of selected miRNAs in the organ pathophysiology of the disease we quantified the relative expression of miR-34a-5p, miR-338-3p and miR-350 in brain, heart and liver of PA mice and age-matched controls (two months-old, n = 4; five and 10 months-old, n = 5). The results confirmed that miR-34a-5p, miR-338-3p and miR-350 are upregulated in brain and heart tissues of PA mice at 2 and 5 months of age, while in 10 months-old mice miRNA levels tend to normalize (Fig. 2). In liver, we could detect modest variations in miRNA levels.

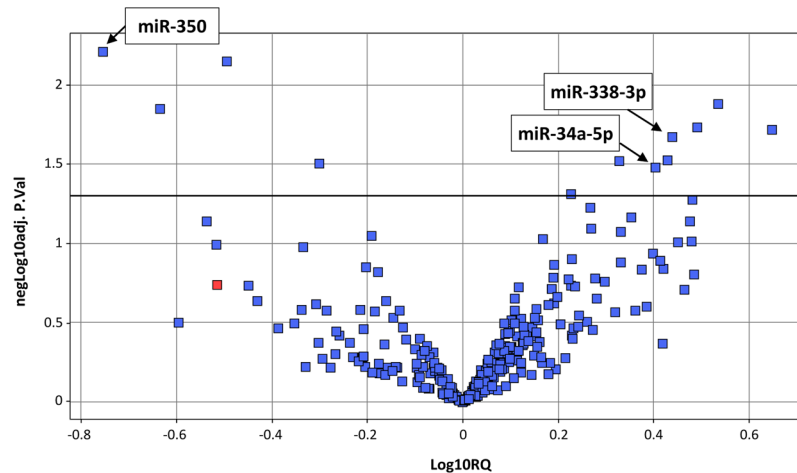


Figure 1. Volcano plot showing the results of the miRNA profile analysis in liver samples of wt and PA mouse. Following qRT-PCR, Ct values were assigned using the SDS2.4 software (Applied Biosystems, Thermo-Fischer) and Ct values above 37,0 were considered as non-detected. MicroRNAs showing very low responses (Ct > 35) in most of the samples of both groups were also removed for further analysis. Finally, Ct values were analyzed using the StatMiner software (Integromics, Perkin-Elmer). The integrated GeNorm software was used to check the stability of putative endogenous genes and a final number of seven was used for normalization (see materials & methods section). Relative comparison of gene expression was made using the wt samples as the reference for the *Pcca*^{-/-} (A138T) group and the geometric mean of selected endogenous genes for normalization. Individual RQ (relative quantity) values as well as statistical *p* values were calculated for the detected 286 miRNAs and represented in log10 scale in the form of a volcano plot.

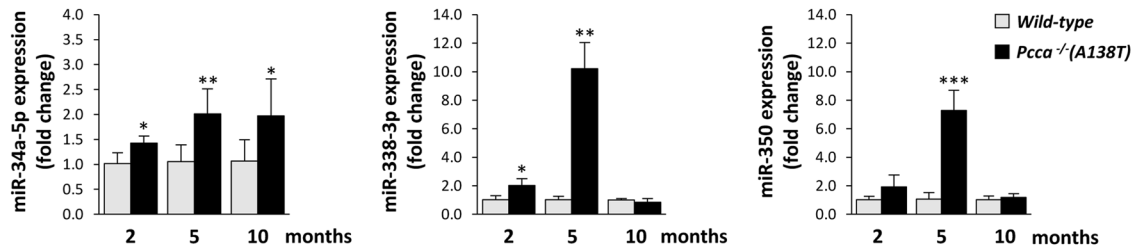
miRNA	RQ	Validated target genes	Biological process	Role in disease	References
miR-31-3p	4.5	<i>RhoA</i>	Proliferation and migration	Cancer	53
miR-691	3.4	No data	No data	No data	
miR-700-3p	3.1	No data	No data	No data	
miR-29a-5p	3.1	No data	No data	Cancer	54
miR-501-3p	3	<i>Gria1</i>	Neuro-transmission	No data	55
miR-338-3p*	2.7	<i>Aatk, Atp5g1, CoxIV</i>	Axonal guidance, apoptosis, mitochondrial function	Cancer, neurodegeneration	42, 56
miR-139-3p	2.7	<i>MMP11</i>	Extracellular matrix organization	Cancer	57
miR-34a-5p*	2.5	<i>Bcl-2, Notch1, Map2k1, Sirt1</i>	Apoptosis, mitochondrial function, oxidative stress response	Cancer, Alzheimer, cardiomyopathy	29, 30, 34, 43, 44
miR-335-3p	2.1	<i>Ank3</i>	No data	No data	58
miR-1949	1.7	<i>Rb1</i>	Cell cycle control	Cancer	59
miR-326-3p	0.5	<i>Bcl-xl, Notch1/2</i>	Apoptosis, proliferation	Cancer	60, 61
miR-671-5p	0.3	<i>Smarcb1</i>	Proliferation	Cancer	62
miR-503-3p	0.2	No data	No data	No data	
miR-350*	0.2	<i>p38, Jnk</i>	Apoptosis	Cardiac hypertrophy	32

Table 1. Dysregulated miRNAs in PA mouse liver. *miRNAs selected for further studies.

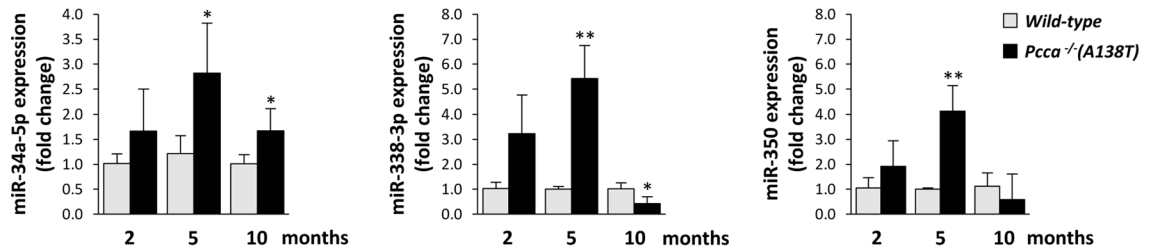
Target genes are inversely down-regulated in PA mouse tissues. With the aim of identifying altered cellular pathways in PA that could contribute to the pathophysiology of the disease, thus identifying potential novel therapeutic targets, we analyzed the expression of target genes of the dysregulated miRNAs in heart and brain tissues of 5 months-old mice. These samples exhibit highest expression levels of the candidate miRNAs and represent relevant tissues in PA pathology. We selected genes involved in apoptosis, oxidative stress response and/or mitochondrial function, all of them experimentally validated targets of the corresponding miRNA as annotated in miRTarbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>). We analyzed the expression of the following genes by western blot analysis of the encoded proteins: BCL2, NOTCH1 and SIRT1 (miR-34a-5p targets), ATP5G1 (miR-338-3p target) and JNK and p38 (miR-350 targets). We could not observe any significant differences in NOTCH1 or SIRT1 expression (data not shown). For the remaining targets, the results showed a decrease in protein expression levels in PA mice compared to controls (Fig. 3).

p38 and JNK belong to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily, which play an essential role in cellular signaling as response to stress. We investigated whether there were changes in their activation

a) Brain



b) Heart



c) Liver

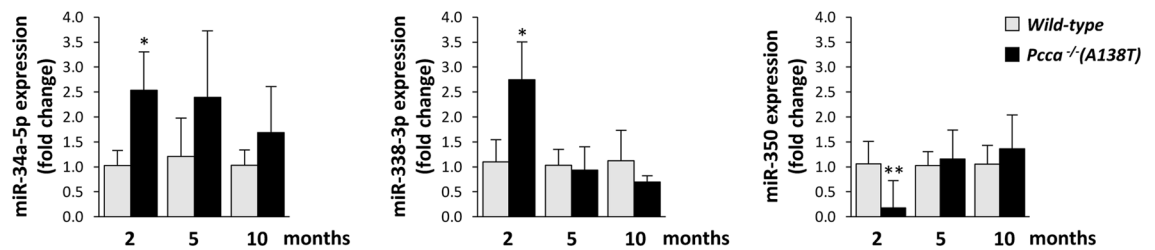


Figure 2. Relative expression levels of miR-34a-5p, miR-338-3p and miR-350 in brain (a), heart (b) and liver (c) tissues from PA mice at different ages. miRNA analysis was performed for wt and PA mouse samples (n = 4–5 per group) by qRT-PCR analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

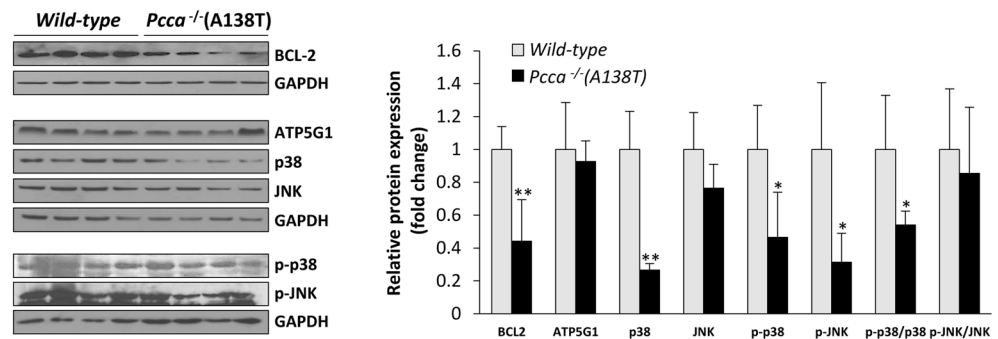
(phosphorylation) state in addition to the observed decrease in total protein levels. As shown in Fig. 3, no phosphorylated p38 (p-p38) was detectable in heart samples from PA mice, while in brain a significant decrease was observed. Phosphorylated JNK (p-JNK) was decreased in brain and heart, in the latter not reaching statistical significance.

Functional analysis in cellular models. As previously mentioned, the regulation of the selected target genes by miR-34a-5p, miR-338-3p and miR-350 has been validated in experimental models, as referenced in miRTarbase^{31–36}. To provide additional evidence, we performed overexpression and inhibition analysis *in vitro* using miRNA mimics and inhibitors. qRT-PCR studies in normal and patients' fibroblasts indicated that none of the three candidate miRNAs are expressed in this cell type. Thus, functional analysis was carried out in Hep3B and SH-SY5Y cells (for miR-34a-5p and miR-338-3p), or in HL-1 and N2A cells (for miR-350, a rodent specific miRNA), cell lines in which the miRNAs are readily detected. After transfection, miRNA levels were assessed by qRT-PCR and targets were analyzed by western blot analysis. In each case, transfection of miRNA mimics or inhibitors resulted in a detectable increase or decrease, respectively, in the corresponding miRNA levels. Western blotting revealed the inverse downregulation of BCL2 with miR-34a-5p mimics and of ATP5G1 with miR-338-3p mimics. In HL-1 and N2A cells, p38 was also down-regulated after transfection with miR-350 mimics (Fig. 4). In these cellular systems, we could not detect significant changes in BCL2, ATP5G1, p38 or JNK protein levels after transfection with the corresponding inhibitors/antagomiRs (data not shown).

Plasma miRNA alterations in PA patients. To translate the results obtained in PA mice to a clinical setting we sought to analyze the selected miRNAs in PA patients' samples. As mentioned above, none of the three miRNAs are expressed in fibroblast samples. We decided to analyze their presence as circulating miRNAs in plasma samples, which would be relevant to investigate their potential as minimally invasive biomarkers. In PA mice, we could indeed detect the three miRNAs in plasma, at reduced levels compared to wt mice samples (Supplementary Fig. 2).

In PA patients, as a first step, we performed whole miRNome profiling analyzing the differences in miRNA levels between pooled plasma samples from patients at diagnosis (<1 month of age) and age-matched

a) Brain



b) Heart

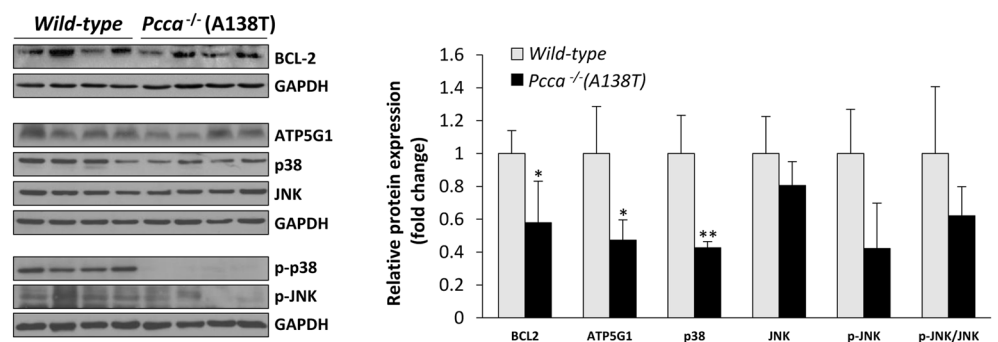


Figure 3. Expression levels of target genes by western blot analysis of the corresponding proteins in wt and PA brain (a) and heart (b) tissues. Representative cropped blots of BCL2 (miR-34a-5p target), ATP5G1 (miR-338-3p target), p38, JNK (miR-350 targets) and activated p-JNK and p-p38, along with the results of protein quantification performed by laser densitometry ($n = 4-5$ per group, 5 months-old mice). In each blot, GAPDH was used as loading control. Data represent mean \pm standard deviation of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

individuals (two pools of patients, and two pools of control individuals, each pool including 4–5 individual samples). miRNome profiling was performed using PCR panels with pre-aliquoted primers for 752 human miRNAs. A total of 352 miRNAs were quantifiable. Interestingly, more than half (60%) are not included in commercial kits for serum/plasma samples focused in abundant plasma miRNAs detected in adult individuals. A total of 73 miRNAs were found dysregulated (fold-change $>$ or $<$ 1.5 in PA samples versus controls), 33 upregulated and 40 downregulated (Supplementary Table 1). Of note, miR-34a-5p and miR-338-3p were included among these miRNAs, as well as others (miR-29a-5p, miR-31-3p, miR-326 and miR-335-3p) also found dysregulated in liver samples of the PA mouse model (Table 1).

At a second stage, we examined the relative expression levels of miR-34a-5p and miR-338-3p in individual plasma samples in three different patient cohorts and their matched controls: 1) neonatal patients at diagnosis ($<$ 1 month old) ($n = 8$ per group); 2) 2–10 year-old patients at follow-up ($n = 12$ per group) and 3) 12–25 year-old patients at follow-up ($n = 8$ per group). Initial analysis of the results with this limited number of samples showed no significant differences in miRNA levels between *PCCA* and *PCCB* deficient patients or between female and male individuals, indicating that these are not main factors contributing to the altered miRNA levels reported. Taken together, the results show a significant increase in miR-34a-5p plasma levels in neonatal PA samples and a decrease of both miR-34a-5p and miR-338-3p in older patients (Fig. 5).

Discussion

PA is a potentially lethal inborn metabolic disorder for which there is no efficient treatment. Although the genetic cause and the origin of the biochemical alterations are well known, the molecular pathogenesis of the disease resulting in multiorgan complications, the prognosis and the response to therapy are yet incompletely understood. Here, we describe the analyses of miRNAs and target genes in different tissues of the *Pcca*⁻¹(A138T) mouse model of the disease, as well as the circulating miRNome in PA patients' samples. The results identify miRNAs dysregulated in PA disease, some identified both in mouse and in human samples, and show target genes potentially involved in secondary pathologies downstream of the primary gene defect that could aid in the identification of therapeutic targets.

The correlation between PCC deficiency and altered miRNA expression is a priori elusive and could be related to the metabolic disturbances originated, which could act as signals for the modulation of miRNA levels. To date, knowledge of the underlying reasons and mechanisms behind changes in miRNA expression is still limited,

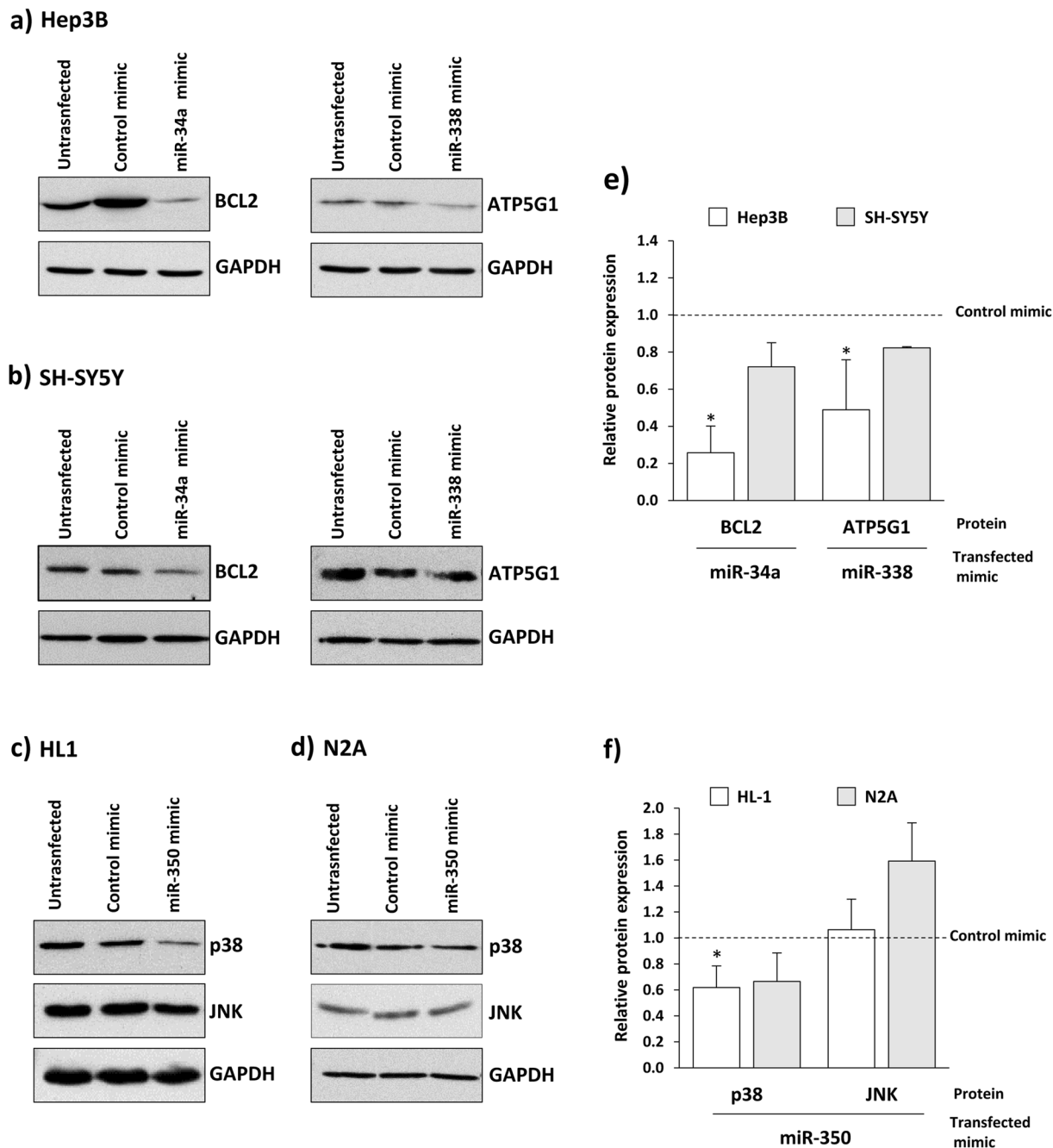


Figure 4. Western blot analysis of target genes expression after transfection with miRNA mimics. miR-34a-5p and miR-338-3p mimics were transfected in Hep3B (a) and SH-SY5Y cells (b) and miR-350 mimics in HL-1 (c) and N2A cells (d). The figure shows representative cropped western blots of corresponding targets along with the results of protein quantification performed by laser densitometry (e and f). In each blot, GAPDH was used as loading control. Data represent mean \pm standard deviation of three independent experiments. * $p < 0.05$.

although both transcriptional and post-transcriptional regulation of miRNA expression, as well as the effects of endogenous and exogenous compounds have been considered³⁷. The age and tissue-specific differences in miRNA expression in PA mice suggest that different factors controlling the molecular adaptations to PA deficiency are at play, contributing to the complexity of the phenotype and presumably mediating the chronic pathological changes associated with the natural history of the disease.

Among the predicted targets of dysregulated miRNAs identified in PA mouse liver we focused on those involved in mitochondrial function, apoptosis, neurodegeneration or cardiomyopathy, alterations which are consistent with observed abnormalities in the mouse model and in patients^{25, 26, 28}. Although the targets had been previously validated in different experimental systems, the results obtained in cell lines after transfection with miRNA mimics provide additional evidence of the specific miRNA mediated regulation. In our cellular assays, we

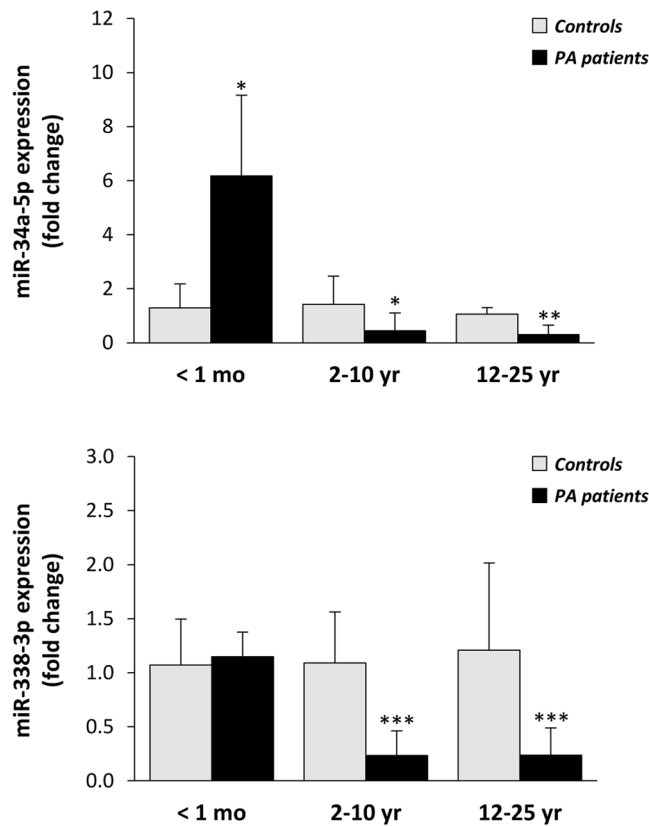


Figure 5. Relative levels of miR-34a-5p and miR-338-3p in plasma samples from PA patients. miRNA analysis was performed by qRT-PCR analysis. PA patient samples and matched controls were grouped according to age: <1 month-old (n = 8 per group), 2–10 year-old (n = 12 per group) and 12–25 year-old (n = 8 per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

could not observe a detectable effect using miRNA inhibitors. This might be due to the specific cell-type analyzed or to the lack of precise disease settings, or could be due to the presence of functionally redundant miRNAs compensating for the decreased miRNA. In this sense, it was recently shown that in the settings of heart disease where miR-34a is elevated, targeting the entire miR-34 family (that includes miR-34a, -34b and 34-c), proved more effective than targeting miR-34a alone³⁸. Another factor to take into account are the rates of protein/mRNA turnover or of transcription/translation which could limit the detection by standard western blot analysis of modest protein decreases, which is what is expected for miRNA regulation³⁹. However, the overall results are indicative of a regulatory effect of miR-34a-5p on BCL2, miR-338-3p on ATP5G1 and miR-350 on p38 in PA mice tissues.

The analysis of target genes allows the identification of signaling pathways that may aid in guiding biological therapeutic discovery. In this sense, our study represents a first step in unraveling novel miRNA regulated pathways and processes involved in the pathogenesis of PA disease. miR-338 is encoded intronically within the apoptosis-associated tyrosine kinase (AATK) gene in mice and humans. Both AATK and miR-338 are highly conserved genes, mainly expressed in the central nervous system, where they play a role during differentiation, apoptosis and possibly neuronal degeneration⁴⁰. miR-338-3p has been found associated with axonal mitochondria where it regulates the expression of nuclear encoded mitochondrial mRNAs encoding subunits of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) machinery^{31,41}. Recently, we described altered expression of OXPHOS complexes in the PA mouse²⁵. The analysis of miR-338-3p expression in different parts of the brain and in cultured neurons of the PA mouse model and the correlation with levels of APT5G1 and other components of the OXPHOS system are subject to future experimental examination. In addition, miR-338-3p modulates the expression of axon guidance genes⁴², which should be evaluated in relation to PA pathology.

miR-34a-5p is described in many studies pointing towards a role in cancer proliferation, and it is also found dysregulated in muscular dystrophies, neurodegenerative diseases and myocardial dysfunction^{43,44}. miR-34a is known to regulate more than 30 oncogenes and, recently, a liposome encapsulated mimic of miR-34 (MRX34) has entered clinical trials, where it has demonstrated clinical proof of concept for solid tumors and hematological malignancies (clinicaltrials.gov). miR-34a is encoded in an intergenic region of chromosome 4 in mouse and in chromosome 1 in humans and is expressed ubiquitously (Human miRNA tissue Atlas: <https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/tissueatlas/>). Among its well characterized targets is the antiapoptotic *Bcl2* gene^{30,45}, which was found inversely downregulated in PA mouse tissues. Other validated targets such as SIRT1 or NOTCH1 did not show differential expression, indicating that the regulatory effects exerted by miRNAs depends on the tissue and disease settings.

Contrary to miR-34a, miR-350 has been sparsely studied. It is an intronic rodent miRNA, encoded within the CEP-170 gene and not conserved in humans. miR-350 was found to induce heart hypertrophy in rat by repressing p38 and JNK stress kinases which leads to an increase in unphosphorylated NFATc3 localized in the nucleus, where it activates the expression of pathological hypertrophy markers³². In our study, we found a reduction in total and phosphorylated active forms of p38 and JNK both in heart and in brain of PA mice. Obviously, other factors are involved in the regulation of the phosphorylation of these stress kinases, but it is tempting to speculate that in PA mouse heart the downregulation of p38 and JNK by miR-350 may be responsible, at least in part, for the development of myocardial hypertrophy via NFAT signaling pathways. In humans, other miRNAs involved in NFAT regulation such as miR-133a-3p⁴⁶, which was found differentially expressed in human PA plasma samples (Supplementary Table 1), are possible candidates to play a role in the development of cardiac hypertrophy.

The detection of miRNAs in plasma reveals their potential as signaling molecules and as disease biomarkers in PA. The pattern of expression (up or downregulation) in PA mouse plasma is not reciprocated in the different tissues, similar to what has been described in other diseases⁴⁷. This indicates that circulating miRNAs may reflect a specific biological response rather than being a result of passive “leakage” from damaged cells.

Most relevant is the discovery in PA patients’ plasma of a specific miRNA signature that includes several miRNAs which were also found dysregulated in the mouse model of the disease, among them miR-34a-5p and miR-338-3p. Although the number of samples in this initial study is limited (due to the low disease prevalence) our results clearly show that these two miRNAs are present at significantly different levels in PA patients’ plasma compared to control individuals, in the three patient cohorts examined, at different ages and situations (at diagnosis or during follow-up as children or adults under standard dietary treatment). Even though there are tissue or species specific expression patterns of miRNA in the PA disease state, the coincidence of some dysregulated miRNAs in the PA mouse and in clinical samples underscore their relevance in PA. The PA patients’ plasma miRNome profiling study provides a focused subset of circulating miRNAs that may be further analyzed in larger patient cohorts at different ages and metabolic situations to evaluate their biomarker potential and their role in disease progression. Interestingly, plasma miR-34a-5p and miR-338-3p show a different profile in neonatal samples at diagnosis and in follow-up samples in older patients (Fig. 5). miRNAs are quite stable in serum and plasma and can be assessed easily using standard and affordable techniques, thus facilitating the observation of the evolution of the pathology at different stages of the disease and of the response to therapy^{48,49}.

This is the first analysis of the miRNA profile associated with PA. A recent study in the related disease methylmalonic aciduria (MMA), which is caused by a genetic defect in a subsequent step in the same metabolic pathway, identified miR-9-1 as downregulated in patients’ plasma, returning to normal levels after B₁₂ treatment⁵⁰. In a subsequent study miR-9-1 was shown to regulate proapoptotic BCL211 in neurons exposed to methylmalonate⁵¹. From the 26 miRNAs described showing differential expression in MMA plasma⁵⁰, none overlapped those identified in this study in PA plasma. It may well be that there are distinct mechanisms for pathogenesis even in related diseases with similar biochemical and clinical alterations, although more in depth studies are needed to corroborate this.

In summary, our study provides evidence showing that miRNAs may modulate PA pathology through post-transcriptional regulation of genes involved in apoptosis, mitochondrial function and stress response. The results open new avenues to develop miRNA-based treatments. There is a pressing need for research into the sequence of events leading to progressive multiorgan complications, notably cardiomyopathy and neurological alterations. Elucidating the mechanisms that underlie these processes might result in therapeutic improvements, thereby improving the quality of life and length of survival of PA patients. In addition, as the role of specific miRNAs is established, and given their stable presence in plasma, miRNAs could potentially serve as complementary biomarkers along with biochemical parameters to guide follow-up and allow accurate clinical phenotype assessment in PA and related organic acidemias.

Methods

Mice handling. All mice used, wt and hypomorphic *Pcca*^{-/-} (A138T), were adult males (2–10 months old) in an *FVB* background²⁸. 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^{28,52}.

Human samples. Anonymized human plasma samples from PA patients, remnants of samples referred to the laboratory for diagnosis or follow-up, were used, with the corresponding informed consent. Overall, 19 samples were from *PCCB* deficient patients, 5 were *PCCA* deficient and 4 were from non-genotyped patients. Control plasma samples were obtained from Sera Lab Ltd (<http://www.serlab.co.uk/>), collected from consented anonymous donors. The study was approved by the Institutional Ethical Committee (Universidad Autónoma de Madrid). All human experimental methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

Cell culture and transfections. Hep3B, N2A and SH-SY5Y cells were cultivated according to standard procedures. Briefly, cells were maintained in Minimum Essential Medium supplemented with 1% glutamine, 5–10% foetal bovine serum (FBS) and antibiotics. HL-1 cardiomyocytes were cultured in Claycomb medium with 10% FBS supplemented with antibiotics and glutamine. 0.3 M ascorbic acid, 1 mM retinoic acid, 5 mg/ml insulin and 0.1 M norepinephrine were added to the medium. Cardiomyocytes cell plates had to be treated with 0.1% gelatin and 25 µg of fibronectin 24 h before seeding. The day before transfection, cells were seeded into 6-well culture

cell plates (~200,000 cells per well). miRNA mimics (Exiqon) and antagomiRs (Exiqon) or miRVana Inhibitors (Ambion) were transfected using Lipofectamine 2000, following the manufacturer's recommendations. 72–96 h after transfection, cells were harvested for miRNA analysis by qRT-PCR and for protein analysis by western blot.

Sample preparation and RNA extraction. Wt and hypomorphic PA mice were sacrificed by cervical dislocation and brain, heart and liver tissues were immediately excised, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until processed. Frozen tissues were pulverized using screws cooled in liquid N_2 to obtain powdered tissue. Cultured cells were harvested by trypsinization and lysed by vortexing in lysis buffer supplied with the RNA isolation kit. Total RNA was extracted from the different powdered organs using miRCURYTM RNA Isolation Kit - Tissue or Cell (Exiqon, Vedbaek, Denmark) according to the manufacturer's instructions. The yield of total RNA was assessed using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc, Rockland, DE, USA).

RNA isolation from mouse and human plasma samples was performed using the miRCURYTM RNA isolation kit-Biofluids (Exiqon, Vedbaek, Denmark) following the manufacturer's instructions. 200 μl of plasma were used and RNA was eluted in 20 μl . Subsequently, cDNA was synthesized using 4 μl of the RNA eluate.

miRNA profiling. Total RNA from wt and PA mouse livers ($n = 4$ per group) and from human plasma samples (controls, $n = 9$ and PA patients, $n = 10$) was reverse transcribed to cDNA with miRCURY LNATM Universal cDNA synthesis kit II (Exiqon, Vedbaek, Denmark). cDNA samples from human plasma were pooled in two controls and two patient groups prior to miRNA profiling. miRNA profiling was performed with microRNA Ready-to-Use PCR Mouse & Rat or Human panel I + II V3 (Exiqon, Vedbaek, Denmark) which contain pre-aliquoted PCR primer sets (Locked Nucleic Acids, LNATM PCR primer sets) in 384-well PCR plates for 752 mouse and rat or human microRNAs, respectively. Real-time PCR amplification was performed with ExiLENT SYBR[®] Green master mix (Exiqon, Vedbaek, Denmark) in an ABI 7900HT instrument (Applied Biosystems, CA, USA). qRT-PCR reactions and analysis were carried out at Genomics Core Facility, Parque Científico de Madrid, Spain. The ABI software was used to obtain raw threshold cycle (Ct) value for each miRNA. Ct values ≥ 37 were considered negative. The Ct data were analyzed with the StatMiner 4.2.8 software (Integromics; Madrid, Spain). Relative quantification (RQ) or fold-change of each miRNA was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method, with U6 snRNA, RNU1A, RNU5G, miR-103-3p, miR-191-5p, miR-423-3p and Let-7c-5p as internal controls for mouse liver analysis and with miR-let7a, miR-103a-3p, miR-15-5p and miR-191-5p for human plasma samples.

Individual miRNA quantification. The relative expression of selected miRNAs in the different mice tissues, in mice or human plasma samples and in cultured cells was determined by qRT-PCR using the miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR (Exiqon, Vedbaek, Denmark). Following reverse transcription, the cDNA template was amplified using microRNA-specific LNA primers for each miRNA and ExiLENT SYBR[®] Green master mix (Exiqon, Vedbaek, Denmark) in a LightCycler 480 instrument (Roche Applied Biosciences, In, USA), according to the manufacturer's instructions. U6 snRNA and miR-423-3p and miR-23a-3p were used for normalization. The relative miRNA expression was quantified using the comparative threshold method after determining the Ct values for the reference and target genes in each sample set according to the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. All reactions were performed in triplicate.

mRNA quantification. In the analysis of pro-hypertrophic markers, 250 ng of total RNA isolated from mouse heart samples was retrotranscribed using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, CA, USA). The *Nppa* (coding for ANP), *Nppb* (BNP) and *Myh7* (β -MHC) genes were amplified using specific primers (available on request) using the Perfecta SYBR Green FastMix kit (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA) in a LightCycler480 II (Roche Applied Biosciences, In, USA) instrument. GAPDH was used as endogenous control. All samples were run in triplicate, and mRNAs relative expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

Bioinformatics tools. The following miRNA databases and target prediction tools were used to obtain information on selected miRNAs and to identify potential target genes: miRBase (www.mirbase.org), TargetScan (www.targetscan.org), MiRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>), microRNA.org (<http://www.microrna.org/>), DIANA TOOLS-mirPath (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpath>), Ingenuity Target Explorer (<http://targetexplorer.ingenuity.com>) and Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, Qiagen, Hilden, Germany). miR2Disease database (<http://www.mir2disease.org/>) was used to review the association of dysregulated candidate miRNAs with human diseases.

Western blotting. Proteins from mouse tissues were isolated by disrupting powdered 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 TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany) (two rounds of 90 seconds at 20 Hz) and centrifuged 30 min at 4°C . The supernatant fraction was collected and protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

For western blot analysis from transfected cells, these were lysed by freeze-thawing in lysis buffer with protease and phosphatase inhibitors. Equal amounts of lysed extracts (50–100 μg protein) were loaded on a 10% or 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 BCL2 (1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), SIRT1 (1:1,000, Millipore, MA, USA), NOTCH1 (1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), ATP5G1 (1:1,000, Abcam, Cambridge, UK), p38, JNK, Phospho-p38 and Phospho-JNK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, used at 1:1,000). Secondary antibodies used were goat anti-rabbit or goat anti-mouse (1:5,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). For loading control, membranes were immunostained with GAPDH antibody (1:5,000, Abcam, Cambridge, UK). 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).

Statistical analysis. Data were presented as mean \pm SD. To analyze significant differences, the distribution of the two groups was compared using two-tailed unpaired T-test distribution. *p* values below 0.05 were considered statistically significant: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

References

- Ameres, S. L. & Zamore, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 475–488 (2013).
- Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* **16**, 421–433 (2015).
- Chi, S. W., Hannon, G. J. & Darnell, R. B. An alternative mode of microRNA target recognition. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 321–327 (2012).
- Martin, H. C. *et al.* Imperfect centered miRNA binding sites are common and can mediate repression of target mRNAs. *Genome Biol* **15**, R51 (2014).
- Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
- Lin, S. & Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* **15**, 321–333 (2015).
- Wang, F., Chen, C. & Wang, D. Circulating microRNAs in cardiovascular diseases: from biomarkers to therapeutic targets. *Front Med* **8**, 404–418 (2014).
- Absalon, S., Kochanek, D. M., Raghavan, V. & Krichevsky, A. M. MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons. *J Neurosci* **33**, 14645–14659 (2013).
- Minones-Moyano, E. *et al.* MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet* **20**, 3067–3078 (2011).
- Christopher, A. F. *et al.* MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res* **7**, 68–74 (2016).
- De Guire, V. *et al.* Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clin Biochem* **46**, 846–860 (2013).
- Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. & Zhang, C. Y. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* **22**, 125–132 (2012).
- Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654–659 (2007).
- Iguchi, H., Kosaka, N. & Ochiya, T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol* **3**, 478–481 (2010).
- Kosaka, N. *et al.* Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* **285**, 17442–17452 (2010).
- Mittelbrunn, M. *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications* **2**, 282 (2011).
- Keller, A. & Meese, E. Can circulating miRNAs live up to the promise of being minimal invasive biomarkers in clinical settings? *Wiley Interdiscip Rev RNA* **7**, 148–156 (2016).
- Christian, P. & Su, Q. MicroRNA regulation of mitochondrial and ER stress signaling pathways: implications for lipoprotein metabolism in metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **307**, E729–737 (2014).
- Yang, B. F., Lu, Y. J. & Wang, Z. G. MicroRNAs and apoptosis: implications in the molecular therapy of human disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 951–960 (2009).
- Wajner, M. & Goodman, S. I. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. *J Bioenerg Biomembr* **43**, 31–38 (2011).
- Mc Guire, P. J., Parikh, A. & Diaz, G. A. Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab* **98**, 173–180 (2009).
- Rivera-Barahona, A., Perez, B., Richard, E. & Desviat, L. R. Role of miRNAs in human disease and in Inborn Errors of Metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease in press* (2017).
- Fenton, W. A., Gravel, R. A. & Rosenberg, L. E. in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (eds C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. Sly, & D. Valle) 2165–2190 (McGraw-Hill, 2001).
- Richard, E., Perez, B., Perez-Cerda, C. & Desviat, L. R. Understanding molecular mechanisms in propionic acidemia and investigated therapeutic strategies. *Expert Opinion on Orphan Drugs* **3**, 1427–1438 (2015).
- Gallego-Villar, L. *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* **96**, 1–12 (2016).
- Pena, L. & Burton, B. K. Survey of health status and complications among propionic acidemia patients. *Am J Med Genet A* **158A**, 1641–1646 (2012).
- Pena, L. *et al.* Natural history of propionic acidemia. *Mol Genet Metab* **105**, 5–9 (2012).
- Guenzel, A. J. *et al.* Generation of a hypomorphic model of propionic acidemia amenable to gene therapy testing. *Mol Ther* **21**, 1316–1323 (2013).
- Yamakuchi, M., Ferlito, M. & Lowenstein, C. J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 13421–13426 (2008).
- Wang, X. *et al.* miR-34a, a microRNA up-regulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, inhibits bcl2 translation. *Brain Res Bull* **80**, 268–273 (2009).
- Aschrafi, A. *et al.* MicroRNA-338 regulates the axonal expression of multiple nuclear-encoded mitochondrial mRNAs encoding subunits of the oxidative phosphorylation machinery. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **69**, 4017–4027 (2012).
- Ge, Y. *et al.* MicroRNA-350 induces pathological heart hypertrophy by repressing both p38 and JNK pathways. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 1–10 (2013).
- Aranha, M. M., Santos, D. M., Sola, S., Steer, C. J. & Rodrigues, C. M. miR-34a regulates mouse neural stem cell differentiation. *PLoS One* **6**, e21396 (2011).
- Pang, R. T. *et al.* MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis* **31**, 1037–1044 (2010).
- Harris, T. A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J. T. & Lowenstein, C. J. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 1516–1521 (2008).
- Aouadi, M. *et al.* Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. *Nature* **458**, 1180–1184 (2009).
- Gulyaeva, L. F. & Kushlinskiy, N. E. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med* **14**, 143 (2016).
- Ooi, J. Y. *et al.* Identification of miR-34 regulatory networks in settings of disease and anti-miR-therapy: Implications for treating cardiac pathology and other diseases. *RNA Biol* **1–14** (2016).
- Baek, D. *et al.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64–71 (2008).

40. Kos, A. *et al.* A potential regulatory role for intronic microRNA-338-3p for its host gene encoding apoptosis-associated tyrosine kinase. *PLoS One* **7**, e31022 (2012).
41. Vargas, J. N. *et al.* Axonal localization and mitochondrial association of precursor microRNA 338. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **73**, 4327–4340 (2016).
42. Kos, A. *et al.* MicroRNA-338 Attenuates Cortical Neuronal Outgrowth by Modulating the Expression of Axon Guidance Genes. *Mol Neurobiol* (2016).
43. Sarkar, S. *et al.* Expression of microRNA-34a in Alzheimer's disease brain targets genes linked to synaptic plasticity, energy metabolism, and resting state network activity. *Brain Res* **1646**, 139–151 (2016).
44. Boon, R. A. *et al.* MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* **495**, 107–110 (2013).
45. Zhou, Y. *et al.* Secreted fibroblast-derived miR-34a induces tubular cell apoptosis in fibrotic kidney. *J Cell Sci* **127**, 4494–4506 (2014).
46. Li, Q., Lin, X., Yang, X. & Chang, J. NFATc4 is negatively regulated in miR-133a-mediated cardiomyocyte hypertrophic repression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H1340–1347 (2010).
47. Roberts, T. C. *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* **1**, e39 (2012).
48. Wang, G. K. *et al.* Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* **31**, 659–666 (2010).
49. Trelinska, J. *et al.* Abnormal serum microRNA profiles in tuberous sclerosis are normalized during treatment with everolimus: possible clinical implications. *Orphanet J Rare Dis* **11**, 129 (2016).
50. Li, Y. *et al.* A Primary Study on Down-Regulated miR-9-1 and Its Biological Significances in Methylmalonic Acidemia. *J Mol Neurosci* **53**, 280–286 (2014).
51. Li, Y. *et al.* MicroRNA-9 regulates neural apoptosis in methylmalonic acidemia via targeting BCL2L1. *Int J Dev Neurosci* **36**, 19–24 (2014).
52. Hofherr, S. E. *et al.* Short-term rescue of neonatal lethality in a mouse model of propionic acidemia by gene therapy. *Hum Gene Ther* **20**, 169–180 (2009).
53. Chang, K. W. *et al.* Passenger strand miRNA miR-31* regulates the phenotypes of oral cancer cells by targeting RhoA. *Oral Oncol* **49**, 27–33 (2013).
54. Clancy, C., Joyce, M. R. & Kerin, M. J. The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark* **15**, 103–113 (2015).
55. Hu, Z. *et al.* miR-501-3p mediates the activity-dependent regulation of the expression of AMPA receptor subunit GluA1. *J Cell Biol* **208**, 949–959 (2015).
56. Tomasetti, M., Neuzil, J. & Dong, L. MicroRNAs as regulators of mitochondrial function: role in cancer suppression. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 1441–1453 (2014).
57. Yonemori, M. *et al.* Dual tumor-suppressors miR-139-5p and miR-139-3p targeting matrix metalloproteinase 11 in bladder cancer. *Cancer Sci* **107**, 1233–1242 (2016).
58. Edinger, R. S. *et al.* Aldosterone regulates microRNAs in the cortical collecting duct to alter sodium transport. *J Am Soc Nephrol* **25**, 2445–2457 (2014).
59. Yu, L. *et al.* Dysregulation of renal microRNA expression after deep hypothermic circulatory arrest in rats. *Eur J Cardiothorac Surg* **49**, 1725–1731 (2016).
60. Yu, S. *et al.* miR-326 targets antiapoptotic Bcl-xL and mediates apoptosis in human platelets. *PLoS One* **10**, e0122784 (2015).
61. Kefas, B. *et al.* The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with notch and has therapeutic potential against brain tumors. *J Neurosci* **29**, 15161–15168 (2009).
62. Papp, G., Krausz, T., Stricker, T. P., Szendroi, M. & Sapi, Z. SMARCB1 expression in epithelioid sarcoma is regulated by miR-206, miR-381, and miR-671-5p on Both mRNA and protein levels. *Genes Chromosomes Cancer* **53**, 168–176 (2014).

Acknowledgements

The technical assistance of I. Manso is 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 numbers SAF2013-43005-R and SAF2016-76004-R) and by Comunidad de Madrid (MITOLAB S2010/BMD-2402). Centro de Biología Molecular Severo Ochoa receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

Author Contributions

A.R., A.F. and R.R. performed the experiments and prepared the figures. C.P. and M.U. provided patient samples and advice. M.A.B. provided the hypomorphic mouse model and advice. B.P., E.R. revised the work and the manuscript. L.R.D. conceived the study, designed and supervised the work and wrote the main manuscript text. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-06420-8

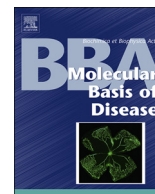
Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017



Intracellular calcium mishandling leads to cardiac dysfunction and ventricular arrhythmias in a mouse model of propionic acidemia

M. Tamayo^{a,1}, A. Fulgencio-Covián^{b,1,2}, J.A. Navarro-García^c, A. Val-Blasco^d, G. Ruiz-Hurtado^{c,3}, M. Gil-Fernández^d, L. Martín-Nunes^a, J.A. Lopez^{e,3}, L.R. Desviat^{b,2}, C. Delgado^{a,*,3}, E. Richard^{b,*,2}, M. Fernández-Velasco^{d,*,*,3}

^a Biomedical Research Institute "Alberto Sols" CSIC-UAM, Madrid, Spain

^b Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

^c Cardiorenal Translational Laboratory, Institute of Research i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

^d Innate Immune Response Group, IdiPAZ, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

^e Laboratorio de Proteómica Cardiovascular, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Propionic acidemia
Intracellular calcium mishandling
SERCA2a
Cardiac dysfunction
Ventricular arrhythmias

ABSTRACT

Propionic acidemia (PA) is a rare metabolic disease associated with mutations in genes encoding the α and β subunits of the enzyme propionyl-CoA carboxylase. The accumulation of toxic metabolites results in mitochondrial dysfunction, increased reactive oxygen species production and oxidative damage, which have been associated with the disease pathophysiology. Clinical symptoms are heterogeneous and include cardiac complications, mainly cardiac dysfunction and arrhythmias, which are recognized as one of the major life-threatening manifestations in patients. We aimed to investigate the molecular mechanisms underlying the cardiac phenotype using a hypomorphic mouse model (*Pcca*^{-/-}(A138T)) that recapitulates some biochemical and clinical characteristics of PA. We demonstrate that *Pcca*^{-/-}(A138T) mice present with depressed cardiac function along with impaired cell contractility when compared to the wild-type mice. Cardiac dysfunction in *Pcca*^{-/-}(A138T) mice was associated with lower systolic Ca^{2+} release ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients), impairment in the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} load and decreased Ca^{2+} re-uptake by SR- Ca^{2+} ATPase (SERCA2a). These functional changes correlated well with the depressed activity of SERCA2a, the elevated ROS levels and SERCA2a oxidation rate in cardiomyocytes isolated from *Pcca*^{-/-}(A138T) mice. In addition, decreased SR- Ca^{2+} load in *Pcca*^{-/-}(A138T) cardiomyocytes was associated with increased diastolic Ca^{2+} release. The increase in Ca^{2+} sparks, Ca^{2+} waves and spontaneous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in *Pcca*^{-/-}(A138T) cardiomyocytes could be responsible for the induction of ventricular arrhythmias detected in these mice. Overall, our results uncover the role of impaired Ca^{2+} handling in arrhythmias and cardiac dysfunction in PA, and identify new targets for the development of therapeutic approaches for this devastating metabolic disease.

1. Introduction

Metabolic cardiomyopathies develop secondary to a broad range of pathological conditions including inherited metabolic diseases [1]. These pathologies can be caused by disturbances in metabolism produced either by mitochondrial DNA defects or by the deficiency of enzymes involved in metabolic pathways. One such example is

propionic acidemia (PA, OMIM606054, ORPHA:35), which results from the deficiency of the mitochondrial enzyme propionyl-CoA carboxylase (PCC), and leads to the accumulation of metabolic intermediates. PA is one of the most frequent life-threatening organic acidemias caused by mutations in the *PCCA* or *PCCB* genes that encode the two subunits of the PCC enzyme. PCC catalyzes the carboxylation of propionyl-CoA to D-methylmalonyl-CoA, which ultimately enters the Krebs cycle as

* Correspondence to: C. Delgado, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain.

** Correspondence to: E. Richard, Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

*** Correspondence to: M. Fernández-Velasco, Instituto de Investigación Hospital la Paz, Idipaz, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain.

E-mail addresses: cdelgado@iib.uam.es (C. Delgado), erichard@cbm.csic.es (E. Richard), maria.fernandez@idipaz.es (M. Fernández-Velasco).

¹ These authors contributed equally.

² CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER, ISCIII), Madrid, Spain.

³ CIBER de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV, ISCIII), Madrid, Spain.

succinyl-CoA. Propionyl-CoA is common to the pathway for degradation of several amino acids (isoleucine, valine, threonine and methionine), odd-chain fatty acids and cholesterol [2].

PA is a disorder of renal, gastrointestinal, immune, nervous and cardiovascular systems [3]. Cardiac symptoms have been recognized as important complications of PA since 1993 [4,5], but they do not appear to be related to disease severity [6,7], and are considered progressive late-onset complications and one of the major causes of disease mortality [8]. The most frequent cardiac complications found in patients with PA are systolic dysfunction (decreased ejection fraction, a measure of the amount blood leaving the heart with each contraction), cardiac arrhythmias and structural remodeling [7,9,10]. Also, heart rhythm problems, including prolonged QTc interval, tachycardia, ventricular ectopic beats, bradycardia and conduction abnormalities, have been described in patients [1,9,11–16].

The development of a hypomorphic mouse model for PA that survives into adulthood has facilitated the study of the mechanisms involved in the disease pathophysiology. Because genetic knock-out of *Pcca* results in early post-natal death, a *Pcca*^{-/-} (A138T) (hereafter termed PA) mouse model was generated on a *Pcca*^{-/-} background by introducing a human transgene with a mutation identified in patients (p.A138T), which retains 9% residual activity [17,18]. These mice recapitulate some biochemical and clinical symptoms found in patients with PA. Elevated expression of *Nppa* and *Nppb*, encoding atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP), respectively, biomarkers of cardiac damage, have been found elevated in hearts of 5–8-month-old PA mice [17,19]. Furthermore, PA mice present with mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress in different tissues including the heart, mimicking the findings reported in patients' samples [20]. The documented secondary mitochondrial dysfunction in PA is related to the accumulation of propionyl-CoA and other toxic metabolites, and results in a bioenergetic deficit, particularly in high energy-demanding tissues such as the heart [21]. Importantly, both metabolic disturbances and increased levels of reactive oxygen species (ROS) have been related to cardiac dysfunction, mainly through the functional impairment of key proteins involved in excitation-contraction (EC) coupling [22,23].

Cardiac dysfunction and ventricular arrhythmias are closely related to changes in intracellular Ca²⁺ homeostasis. Cardiac EC coupling is the process of the electrical excitation of the cardiomyocyte to contract the heart, and is initiated by depolarization of the sarcolemma as an action potential sweeps over a cell [24]. The initial depolarization activates sarcolemma L-type Ca²⁺ channels (I_{CaL}) that generate a small influx of Ca²⁺ into the cytosol, which in turn triggers a large release of Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum (SR) through ryanodine receptors (RyR). This Ca²⁺-induced Ca²⁺ release results in a massive increase of intracellular Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), which activates the myofilaments and promotes cell contraction. [Ca²⁺]_i returns to baseline by two main mechanisms: Ca²⁺ re-uptake by the SR-Ca²⁺ ATPase (SERCA2a) and activation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX). In mice, 90% of cytosolic Ca²⁺ is removed by SERCA2a [25], a key regulator of SR-Ca²⁺ uptake and load.

During diastole, RyR2 channels in cardiomyocytes are predominantly closed; however, they can also open spontaneously, mediating Ca²⁺ flux into the cytosol. Ca²⁺ can trigger inter-RyR2 Ca²⁺-induced Ca²⁺ release, generating Ca²⁺ sparks [26]. Ca²⁺ spark frequency is normally low during diastole because spontaneous long-duration RyR2 opening is relatively infrequent. In some cardiac diseases, however, abnormally large or frequent sparks can activate RyR2 channels at neighboring release sites, generating SR-Ca²⁺ waves or spontaneous [Ca²⁺]_i transients [27,28]. Diastolic Ca²⁺ release can stimulate Ca²⁺ extrusion from the cell by NCX, promoting depolarization during diastole sufficiently to trigger an action potential and possibly initiate a life-threatening arrhythmia.

In the present study, we have explored the cardiac dysfunction and the underlying molecular mechanisms in PA mice using imaging,

electrophysiological, electrocardiographic and proteomic approaches. Our findings reveal that PA mice present with cardiac and cellular contractility abnormalities due to the impairment of systolic Ca²⁺ release and to irregular diastolic Ca²⁺ release, which might explain the cardiac arrhythmias associated with this pathology. All of these changes were related to an increase in oxidative stress in PA cardiomyocytes, likely compromising the function of key partners of EC coupling, such as SERCA2a, which exhibited a high oxidation rate. Our findings provide the first *in vivo* evidence of the pathological mechanisms underlying PA-associated cardiac dysfunction.

2. Materials and methods

2.1. Mice handling

Wild-type (*Wt*) and hypomorphic *Pcca*^{-/-} (A138T) (PA) mice used in this study were adult males on the FVB background [17]. Mice were maintained on standard chow diet and were housed under standardized conditions in a pathogen-free environment at the Animal Facility of the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa and the Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM, 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). The study followed the guidelines for ethical care of experimental animals of the European Union (2010/63/EU). Genotyping was performed using genomic DNA isolated from tail biopsies, as previously described [19].

2.2. Cardiac magnetic resonance

Cardiac magnetic resonance (CMR) imaging was performed with a 7.0 Tesla MR system (Bruker Pharmascan, Bruker, Ettlingen, Germany) at the Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. The main imaging parameters were as follows: echo time (TE) = 1.262 ms; field of view (FOV) = 3 × 3 cm²; slice thickness = 0.8 mm; matrix size = 256 × 256. The acquired data were zero-filled to achieve a reconstructed matrix size of 256 × 256. Heart and respiratory rates were recorded using the 1025 SAM monitoring and gating system (SA Instruments Inc., New York, NY).

Mice were anesthetized with an isoflurane and oxygen mixture (2% in 1 L/min for induction and 1.5% during acquisition). Several images were acquired to localize the heart position. To assess cardiac function, 6–12 images were acquired in the short axis plane to cover the entire left ventricle, and 20 time-frames were sampled to cover one cardiac cycle.

CMR images were analyzed using SEGMENT (Software platform v2.0 R5642, Medviso AB, Sweden). Six central axial slices were selected from each heart and were analyzed by manual detection of left ventricular endocardial and epicardial borders in every 20 time-frames. Data measured were: left ventricular end diastolic volume (μL), left ventricular end systolic volume (μL), ejection fraction (%), left ventricle mass (mg), stroke volume (μL) and cardiac output (mL/min).

2.3. Cardiomyocyte isolation

Ventricular cardiomyocytes were isolated from mice using standard enzymatic digestion [29]. Briefly, mice were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg i.p.) and heparinized (4 U/g i.p.). The heart was rapidly excised and cannulated *via* the ascending aorta on a Langendorff perfusion apparatus. Retrograde perfusion was initiated with a standard Ca²⁺-free Tyrode's solution containing 0.2 mM EGTA over 2–3 min at room temperature and continued for 3–5 min with the same Tyrode's solution containing collagenase type II (1 g/L) (Worthington Biochemical, Lakewood, NY) and CaCl₂ (0.1 mM). The heart was then

removed from the Langendorff apparatus and the ventricles were cut out, finely minced into small pieces, and mechanically dissociated in the enzymatic solution. The cardiomyocyte cell suspension was then filtered through a nylon mesh (250 μm), pelleted by centrifugation for 3 min at $16 \times g$ and suspended in Tyrode's solution containing 0.5 mM CaCl_2 . Cells were centrifuged as before and suspended in a storage solution containing 1 mM CaCl_2 . Tyrode's solution contained (in mM): 130 NaCl, 5.4 KCl, 0.5 MgCl_2 , 25 HEPES, 0.4 NaH_2PO_4 , 22 glucose; the pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Cardiomyocytes were immediately used for the calcium imaging analysis.

2.4. Electrophysiology

Whole-cell voltage-clamp experiments were conducted at room temperature (22–24 °C). Recording of L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}) was obtained using an Axopatch 200B patch clamp amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Current traces were digitized with the Digidata 1440A interface (Molecular Devices) and analyzed using pClamp10 software (Molecular Devices). The patch pipette resistance was 1–2 M Ω . Current density was calculated from the current amplitude (I_{CaL}) normalized to the membrane capacitance. Membrane capacitance (C_m) was elicited by applying ± 10 mV voltage steps from -60 mV and C_m was calculated according to the following equation:

$$C_m = \tau_c I_0 / V_m [1 - (I_\infty / I_0)]$$

where τ_c is the time constant of the membrane capacitance, I_0 the maximum capacitance current value, V_m the amplitude of the voltage step, and I_∞ the amplitude of the steady-state current.

I_{CaL} was elicited by applying 300 ms depolarizing voltage pulses from a holding potential of -50 mV, between -60 to $+60$ mV (with 10 mV steps) at a frequency of 0.2 Hz. Ca^{2+} currents were normalized to cell capacitance to obtain current density. The external Tyrode's solution for I_{CaL} recordings contained (in mM): 140 NaCl, 1.1 MgCl_2 , 5.4 CsCl, 10 glucose, 5 HEPES, 1.8 CaCl_2 ; the pH was adjusted to 7.4 with CsOH. The intracellular recording pipette solution for whole-cell experiments contained (in mM): 100 CsCl, 20 TEACl, 5 EGTA, 10 HEPES, 5 Na_2ATP , 0.4 Na_2GTP , 5 Na_2 creatine phosphate, 0.06 CaCl_2 ; pH adjusted to 7.4 with CsOH.

2.5. Intracellular calcium imaging

Local increases in intracellular Ca^{2+} concentration were recorded in intact isolated cardiomyocytes. Cardiomyocytes were loaded with the fluorescent Ca^{2+} dye Fluo-3 acetomethyl ester (Fluo-3AM) (5 μM) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) [30]. Experiments were performed at room temperature (20–23 °C). Images were obtained with a Zeiss LSM 710 Meta (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) confocal microscope (40 \times , 1.2 NA oil-immersion objective) by scanning the cardiomyocytes with an Argon laser every 1 s. Fluo-3AM was excited at 488 nm and the emitted fluorescence was collected at > 505 nm. Cardiomyocyte surface area was quantified with LSM Zeiss Image Browser 4.2 software (Carl Zeiss).

To obtain $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients, Fluo-3AM-loaded cells were electrically excited at 2 or 4 Hz by field stimulation using two parallel platinum electrodes. The fluorescence values (F) were normalized to the basal fluorescence (F_0) to obtain the fluorescence ratio (F/F_0). The decay time constant of Ca^{2+} transients (τ) was obtained by fitting the decay trace. The rate of upstroke was estimated by normalizing the increment of the peak of Ca^{2+} transients by its decay rate. Spontaneous Ca^{2+} sparks and spontaneous Ca^{2+} transients and waves were acquired in quiescent cells. SR- Ca^{2+} load was assessed by rapid caffeine (10 mM) application to deplete the SR of Ca^{2+} stores, after field-stimulation to reach the steady-state. Arrhythmic activity was analyzed by applying 3 cycles of field electrical stimulation in 2 Hz-paced cells, consisting of 7 electric pulses each cycle. Data analysis was performed using homemade routines with IDL 8 software (Research System Inc., Boulder, CO)

and ImageJ 1.50i software (NIH). Images were corrected for background fluorescence.

2.6. Western blotting

Cardiac tissue was homogenized in a buffer containing 50 mM Tris, 320 mM sucrose, protease/phosphatase inhibitor cocktail and 0.5% CHAPS (all from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Homogenates were centrifuged at $1.700 \times g$ for 15 min at 4 °C, and cleared supernatants were used for immunoblotting. Proteins were separated on SDS-PAGE gels and then transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin and incubated overnight with the following primary antibodies: SERCA2a (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), phospholamban (PLB) (Badrilla, Ltd., Leeds, UK) and GAPDH (Ambion/Life Technologies). Membranes were then incubated with peroxidase-linked secondary antibodies (1:5000) in 2% bovine serum albumin for 60 min at room temperature. Immunoreactive bands were detected using the Pierce Detection System (Rockford, IL).

2.7. Proteomic analysis

Cardiomyocytes were isolated as described above and protein extracts were obtained using TPER buffer (Thermo Fisher Scientific). Two different proteomic analyses were performed. In the initial analysis in which we identified *SERCA2a* modifications, protein digestion was performed in solution as described [31]. The resultant peptide mixture from a tryptic digest (100 μg) of desalted proteins was labeled using chemicals from the iTRAQ reagent 4plex Multi-plex kit (reagents 114, 115 for *Wt* samples and 116 and 117 for *PA* samples) (Applied Biosystems, Foster City, CA) as described [32]. Samples were fractionated using the high-pH, reversed-phase peptide fractionation kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions. The obtained fractions were dried and stored for mass spectrometry (MS) analysis. For quantitative analysis, fractions were resuspended in 10 μL of 0.1% formic acid and analyzed by reverse phase-liquid chromatography and tandem MS (RP-LC-MS/MS) in an Easy-nLC II system coupled to an ion trap LTQ-Orbitrap-Velos-Pro hybrid mass spectrometer (Thermo Scientific) [33]. Peptide identification from raw data (a single search was performed with all nine fractions) was carried out using the PEAKS Studio X search engine (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Canada). A database search was performed against the UniProt *Mus musculus* FASTA database (decoy-fusion database). The following constraints were used for the searches: tryptic cleavage after Arg and Lys, up to two missed cleavage sites, and tolerances of 20 ppm for precursor ions and 0.05 Da for MS/MS fragment ions. The searches were performed allowing optional Met oxidation, Cys carbamidomethylation and iTRAQ reagent labeling at the N-terminus and lysine residues. False discovery rate (FDR) for peptide spectrum matches was limited to 0.01. Only those proteins with at least two distinct peptides discovered from LC/MS/MS analyses were considered reliably identified and were quantified.

Quantitation of iTRAQ-labeled peptides was performed with the PEAKS Studio X, selecting the "Reporter Ion Quantification iTRAQ" under the "Quantifications" options. We used the auto-normalization mode, which calculates a global ratio from the total intensity of all labels in all quantifiable peptides. -10LgP , Quality and Reporter Ion Intensity parameters were used for Spectrum filter and Significance (ANOVA method) for Protein filter. For protein quantification, we considered protein groups for peptide uniqueness, using only the unique peptides, and the modified peptides were excluded. Label Free Quantitation was performed with PEAKS Studio X, selecting "Label Free" under the "Quantifications" options. We used manual input mode for normalization. Quality and Average Intensity were used for Peptide filter and Significance (PEAKS Q method) for Protein filter.

In a second analysis, seeking to identify functional changes in RyR, about 80 μg of protein for each sample were subjected to in-filter

digestion using the FASP protocol with some modifications. Briefly, protein extracts were diluted in 7 M urea and 50 mM Tris-HCl pH 8.5 (Buffer UA) containing 2 mM TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride; Pierce). After incubation at room temperature for 15 min, protein alkylation was performed using 20 mM iodoacetamide (Sigma) for 20 min in the dark. Proteins were loaded onto 10 kDa centrifugal filter devices (NanoSep 10 k Omega, Pall Life Sciences), and buffer was replaced by washing the filters three times with UA buffer, and three further times with 50 mM ammonium bicarbonate. Proteins were digested overnight at 37 °C with modified trypsin (30:1 protein:trypsin (w/w) in 50 mM ammonium bicarbonate; Promega Corp.). The resulting peptides were eluted by centrifugation with 50 mM ammonium bicarbonate and 0.5 M sodium chloride. Trifluoroacetic acid (TFA) was added to a final concentration of 1% and the peptides were desalted onto C18 Oasis-HLB cartridges (Waters, Milford, MA) and dried-down for further analysis.

For stable isobaric labeling, the resulting tryptic peptides were dissolved in 100 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB) buffer, and the peptide concentration was determined by measuring amide bonds with the Direct Detect system (Millipore). Equal amounts of each peptide sample were labeled using the 10-plex TMT Reagents (Thermo Fisher) according to manufacturer's protocol. Peptides were labeled with TMT reagents previously reconstituted with 70 μ L of acetonitrile, and after incubation at room temperature for 1 h, reaction was stopped with 0.5% TFA, incubated for 10 min, and peptides were combined. Samples were concentrated in a Speed Vac, desalted onto C18 Oasis-HLB cartridges and dried-down for further analysis. For increasing proteome coverage, this TMT-labeled sample was fractionated by high-pH reverse phase chromatography (High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit, Pierce), and dried-down for further analysis.

Labeled peptides were analyzed by LC-MS/MS using a C-18 reversed phase nano-column (75 μ m I.D. \times 50 cm, 2 μ m particle size, Acclaim PepMap RSLC, 100 C18; Thermo Fisher Scientific) in a continuous acetonitrile gradient consisting of 0–30% B in 360 min, 50–90% B in 3 min (A = 0.1% formic acid; B = 90% acetonitrile, 0.1% formic acid) at 50 °C. A flow rate of 200 nL/min was used to elute peptides from the nano-column to an emitter nanospray needle for real time ionization and peptide fragmentation on a Thermo Fusion Trybrid Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher). An enhanced FT-resolution spectrum (resolution = 70,000) followed by the MS/MS spectra from the 15th most intense parent ions were analyzed along the chromatographic run. Dynamic exclusion was set at 40 s.

For peptide identification, all spectra were analyzed with Proteome Discoverer (version 2.1.0.81, Thermo Fisher Scientific) using SEQUEST-HT (Thermo Fisher Scientific). For database searching at the Uniprot database containing all sequences from mouse and frequently observed contaminants (UniProt_April27_2016_contam; 48,644 entries), the parameters were selected as follows: trypsin digestion with 2 maximum missed cleavage sites, precursor and fragment mass tolerances of 2 Da and 0.02 Da, respectively, carbamidomethyl cysteine and TMT modifications at N-terminal and Lys residues as fixed modifications, and methionine oxidation as dynamic modification. Peptide identification was performed using the probability ratio method [34]. FDR was calculated using inverted databases and the refined method [35] with an additional filtering for precursor mass tolerance of 15 ppm [36]. Identified peptides had a FDR equal or lower than 1%.

2.8. Analysis of intracellular ROS in isolated cardiomyocytes

ROS production in isolated cardiomyocytes perfused with Tyrode's solution was measured using a ROS-sensitive dye (H₂DCFDA; Thermo Fisher Scientific). Cells were loaded for 30 min with 5 μ M of the probe. The DCF dye was excited with an argon laser at 488 nm in x-y mode and the emission was collected at 503–629 nm. The fluorescence was monitored on a Zeiss LSM 710 Meta confocal microscope (Carl Zeiss).

2.9. Electrocardiography

Electrocardiogram (ECG) analysis was performed on the Small Animal Physiological Monitoring System (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Mice were placed in the prone position on a warm pad at 37 °C during the recordings. ECG recordings were taken in mice lightly anesthetized with isoflurane (1.5% isoflurane/air). ECGs were recorded under these conditions for 5 min (baseline) and for a further 10 min after an injection of isoproterenol/caffeine (3/120 mg/kg, i.p.). ECG registries were converted into LabChart binary files using a cross-platform Java program. Files were analyzed using LabChart 7.0 software (AD Instruments, Sydney, Australia).

2.10. SERCA pump hydrolytic activity

SERCA2a activity was determined as thapsigargin (TGN)-sensitive ATPase, using the method reported by Bartolommei et al. [37] with some modifications. The calibration curve was determined by preparing a standard solution of Pi from a 1 mM aqueous stock solution. Briefly, 50 μ g of heart homogenates were incubated in 1 mL (final volume) of buffer solution at 37 °C for 5 min before starting the reaction with the addition of 1 mmol/L ATP. The buffer solution contained (in mM): 80 KCl, 3 MgCl₂, 0.2 CaCl₂, 5 sodium azide, 0.2 EGTA-potassium salt, 25 MOPS, 0.002 A23187; the pH was adjusted to 7.0 with Tris-HCl. Control experiments were performed in the presence of 1 μ M TGN. The difference of total ATPase activity minus TGN-insensitive ATPase activity was the SERCA hydrolytic activity. Absorbance was determined at 850 nm. The coloring solution contained (in mM): 125 H₂SO₄, 0.5 ammonium-molybdate, 10 ascorbic acid and 0.04 potassium antimony (III) tartrate hydrate.

2.11. Statistical analysis

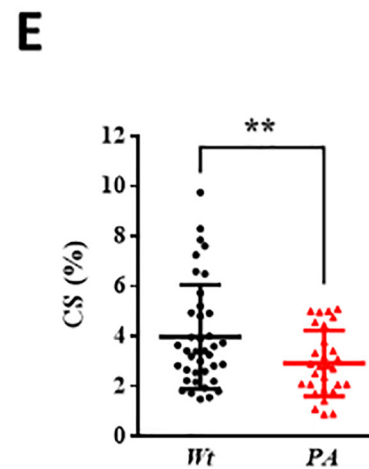
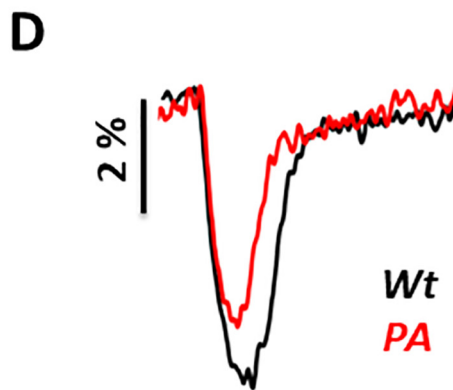
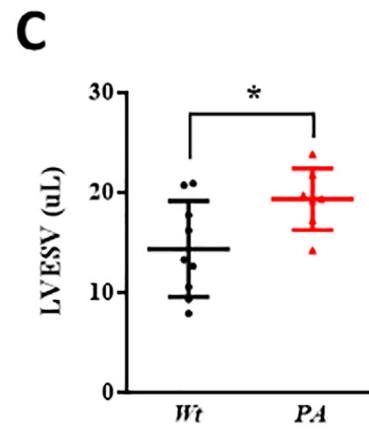
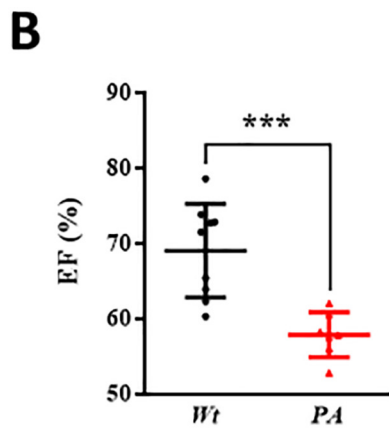
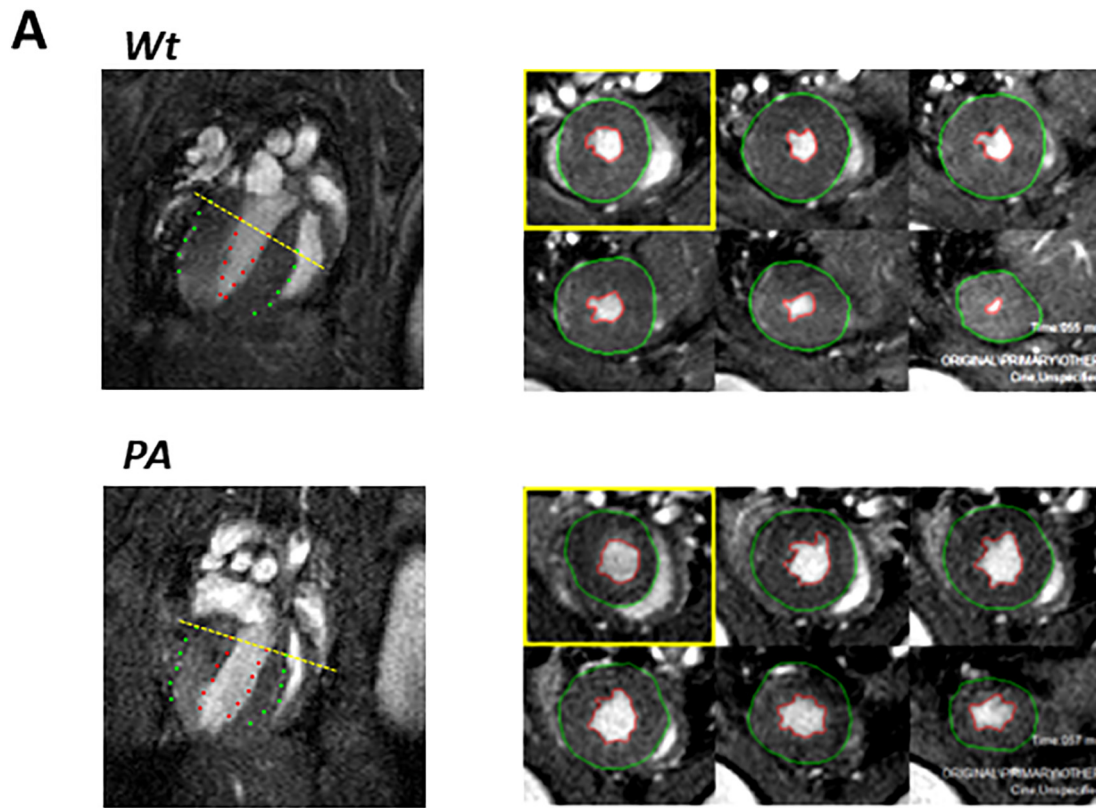
Results were reported as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test or the chi-square test, as appropriate. All statistical analyses were performed with Origin 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA) or GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) and significance was assumed when *p* < .05.

3. Results

3.1. Cardiac function and cell contractility are compromised in PA mice

We first used CMR to characterize cardiac function and structure in *Wt* and *PA* mice at 8 months of age. Notably, we found that when compared to *Wt* mice, 58% of *PA* mice showed depressed cardiac function due to a significant decrease in ejection fraction (Fig. 1A–B). We therefore sought to determine the specific mechanisms involved in cardiac dysfunction in hypomorphic *PA* mice. Cardiac dysfunction was related to the failure of *PA* hearts to complete the systolic cycle (Fig. 1A), with a significant increase in left ventricular volume at the end of systole (Fig. 1C) that clearly indicated impaired cardiac contractility. Analysis of cardiomyocyte contractility supported the observed *in vivo* data. Compared to isolated *Wt* cardiomyocytes, *PA* cardiomyocytes showed significantly depressed cell shortening and slower cell contraction velocity (Fig. 1D and E and Supplementary Fig. 1). These data indicate that hypomorphic *PA* mice present with cardiac and cellular contractility impairment.

Structural analysis of *PA* hearts revealed no evidence of cardiac hypertrophy development (Table 1). Indeed, heart weight/tibia length ratios were comparable between the two experimental groups. Similarly, at the cellular level, cardiomyocyte surface and cell capacitance were also comparable between *PA* and *Wt* cardiomyocytes (Table 1).



(caption on next page)

Fig. 1. Hypomorphic *Pcca*^{-/-} (A138T) mice present cardiac dysfunction and cardiomyocyte contractility impairment. A. Left panel illustrates a single cardiac video image of 4 chambers and a six-segmented image of two cardiac chambers in wild-type (*Wt*) (upper panel) and *Pcca*^{-/-} (A138T) (*PA*) (lower panel) mice. Yellow line indicates the beginning of the segmentation to obtain two chamber images. B, C. Scatter plots show individual and mean values of ejection fraction (EF; B) and left ventricle end systolic volume (LVESV; C) obtained by cardiac magnetic resonance imaging in *Wt* (*N* = 9) and *PA* (*N* = 7) mice. D. Representative traces of percentage cell shortening (CS) obtained in a *Wt* (black) and *PA* (red) cardiomyocyte. E. Percentage CS values obtained in *Wt* (*n* = 39, *N* = 5) and *PA* (*n* = 29, *N* = 4) cardiomyocytes. Results show mean value ± SD **p* < .05; ***p* < .01; ****p* < .001 vs *Wt*. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1Macroscopic, microscopic and cardiac function of *Wt* and *PA* mice.

	<i>Wt</i>	<i>PA</i>
Weight [g]	36.56 ± 1.39 (9)	34.71 ± 1.80 (7)
HR [bpm]	397.2 ± 15.05 (9)	397.9 ± 24.38 (7)
LVEDV [μL]	45.70 ± 2.45 (9)	46.03 ± 2.38 (7)
LVESV [μL]	14.42 ± 1.60 (9)	19.38 ± 1.16 (7)*
EF [%]	69.12 ± 2.07 (9)	57.96 ± 1.13 (7)***
SV [μL]	31.28 ± 1.16 (9)	26.65 ± 1.39 (7)*
CO [mL/min]	12.43 ± 0.68 (9)	12.66 ± 0.69 (7)
LVM [mg]	95.37 ± 4.03 (9)	92.66 ± 4.56 (7)
LVM measured at ED [mg]	83.54 ± 4.02 (8)	82.69 ± 4.01 (7)
LVM measured at ES [mg]	98.11 ± 3.69 (8)	88.86 ± 4.71 (7)
PFR [ml/s]	0.78 ± 0.09 (9)	0.82 ± 0.10 (7)
PER [ml/s]	0.79 ± 0.06 (9)	0.71 ± 0.06 (7)
Heart weight [HW, mg]	216.40 ± 5.78 (8)	217.70 ± 9.07 (7)
Tibia length [TL, mm]	18.57 ± 0.11 (8)	18.68 ± 0.14 (7)
HW/TL ratio	11.65 ± 0.30 (8)	11.65 ± 0.46 (7)
Cell area [μm ²]	3342 ± 128.2 (47)	3199 ± 136.3 (50)
Capacitance [pF]	267 ± 22 (28)	242 ± 10 (26)
LV cavity diameter [mm]	3.54 ± 0.11 (8)	3.73 ± 0.10 (7)
LV diameter [mm]	6.24 ± 0.12 (8)	6.26 ± 0.10 (7)
QTc (ms)	47.66 ± 1.67 (5)	49.47 ± 1.37 (5)
PR interval (ms)	29.71 ± 0.78 (5)	28.81 ± 0.87 (5)

HR: heart rate; LVEDV: left ventricle end diastolic volume; LVESV: left ventricle end systolic volume; EF: ejection fraction; SV: systolic volume; CO: cardiac output; LVM: left ventricle mass; ED: end diastolic; ES: end systolic; PFR: filling rate; PER: emptying rate; QTc: QT corrected.

* *p* < .05.*** *p* < .001 vs *Wt*.

3.2. Systolic Ca²⁺ release, SR-Ca²⁺ uptake and load are impaired in *PA* cardiomyocytes, which present a higher rate of SERCA2a oxidation

We next examined the key regulators of EC-coupling involved in intracellular Ca²⁺ handling in isolated cardiomyocytes. First, we analyzed the sarcolemma L-type Ca²⁺ current (I_{CaL}) in cardiomyocytes using the patch-clamp technique in the whole-cell configuration. Results showed that the mean values of I_{CaL} density obtained from -60 mV to +60 mV were comparable between *Wt* and *PA* cells (Supplementary Fig. 2).

We then determined systolic Ca²⁺ release in field-stimulated isolated cardiomyocytes. The amplitude of [Ca²⁺]_i transients elicited at 2 Hz or 4 Hz were significantly lower in *PA* cardiomyocytes than in equivalent *Wt* cells (*p* < .001; Fig. 2A, B and Supplementary Fig. 3). Analysis of the decay time of [Ca²⁺]_i transients showed slower mean values in *PA* cardiomyocytes than in *Wt* cells (Fig. 2C and Supplementary Fig. 3), which together with the lower values of Tau/peak [Ca²⁺]_i transients ratio obtained in *PA* cells (Fig. 2D and Supplementary Fig. 3) indicated that SR-Ca²⁺ uptake by SERCA2a was impaired in *PA* hypomorphic mouse hearts.

Given these findings, we next analyzed SERCA2a function indirectly, as previously described [38,39]. SERCA2a activity (*k* SERCA2a) was calculated by subtracting the decay rate constant of caffeine-evoked [Ca²⁺]_i transients from the decay rate constant of systolic [Ca²⁺]_i transients. Results showed that *k* SERCA2a was significantly lower in *PA* cells (4.56 ± 0.28 s⁻¹; *n* = 18) than in *Wt* cells (5.78 ± 0.43 s⁻¹; *n* = 19; *p* < .05), clearly indicating an impairment of SERCA2a function in *PA* cardiomyocytes.

To determine whether the impairment in SERCA2a function was

related to changes in SR-Ca²⁺ load, we recorded caffeine-evoked [Ca²⁺]_i transients in both groups, finding that caffeine-evoked [Ca²⁺]_i transients were significantly lower in *PA* cardiomyocytes than in *Wt* cells (*p* < .001; Fig. 2E). By contrast, no changes were found in the kinetics of caffeine-evoked [Ca²⁺]_i transients (3739.25 ± 236.61 ms in *Wt* [*n* = 14] vs 3726.27 ± 362.31 ms in *PA* [*n* = 19] cells).

We next used Western blotting of cardiac tissue homogenates to look for possible changes in SERCA2a protein levels that could account for the functional impairment in SR-Ca²⁺ load and re-uptake in *PA* cardiomyocytes. The results of this analysis showed similar SERCA2a protein levels in both experimental groups (Fig. 3A), and this was confirmed by iTRAQ quantitative proteomics analysis (~1.1-fold SERCA2a levels in *PA* mice). Given that PLB regulates SERCA function, we also examined PLB protein levels in the two groups by Western blotting and found no changes to the PLB/GAPDH ratio between groups (Fig. 3A).

By contrast, when we examined SERCA2a post-translational modifications by label-free proteomic analysis, we found an increase in the number of peptides containing oxidized methionines (methionine 361 was oxidized, and methionines 207, 220, 239, 452 and 622 were de-thiomethylated) in *PA* cardiomyocytes when compared to *Wt* cells (Fig. 3B). These results indicate a higher oxidation rate in the SR-Ca²⁺ ATPase of *PA* cardiomyocytes, which could be involved in the dysfunction of this protein in the hypomorphic *PA* mouse model. Indeed, an analysis of SERCA pump hydrolytic activity showed that ATPase activity was lower in *PA* cardiac samples than in equivalent *Wt* tissue (Fig. 3C).

3.3. ROS levels are increased in cardiomyocytes isolated from hypomorphic *PA* mice

Increased oxidative stress has been associated with *PA* disease pathophysiology [3]. Because our observations indicated a higher SERCA2a oxidation rate in the *PA* mouse model, we next analyzed ROS levels in cardiomyocytes from *Wt* and *PA* mice. Cells were loaded with the ROS-sensitive dye H₂DCFDA and viewed by confocal microscopy. Results showed that fluorescence was significantly higher in *PA* cardiomyocytes than in *Wt* cells (Fig. 3D). These data correlate well with previously reported findings in patient-derived fibroblasts [20] and in heart tissue of the *PA* mouse model [21].

3.4. Increased diastolic Ca²⁺ release and pro-arrhythmic behavior is evident in *PA* cardiomyocytes

Loss of SERCA2a function often results in increased cytosolic Ca²⁺ levels. Indeed, basal fluorescence (F₀) values obtained during [Ca²⁺]_i transients recordings were significantly higher in *PA* cardiomyocytes than in *Wt* cells (Supplementary Fig. 4; *p* < .001), indicating an increase in cytosolic Ca²⁺ levels at rest. We determined diastolic Ca²⁺ release measured as Ca²⁺ sparks and spontaneous Ca²⁺ release (waves and spontaneous [Ca²⁺]_i transients; SCR) in quiescent cardiomyocytes. The frequency of Ca²⁺ sparks normalized to SR Ca²⁺ load was significantly higher in *PA* cells than in *Wt* cells (Fig. 4A). By contrast, the biophysical properties of Ca²⁺ sparks were similar in both groups (Supplementary Fig. 5).

Increased SCR, such as Ca²⁺ waves and spontaneous [Ca²⁺]_i transients, are closely related to ventricular arrhythmias. Analysis of SCR

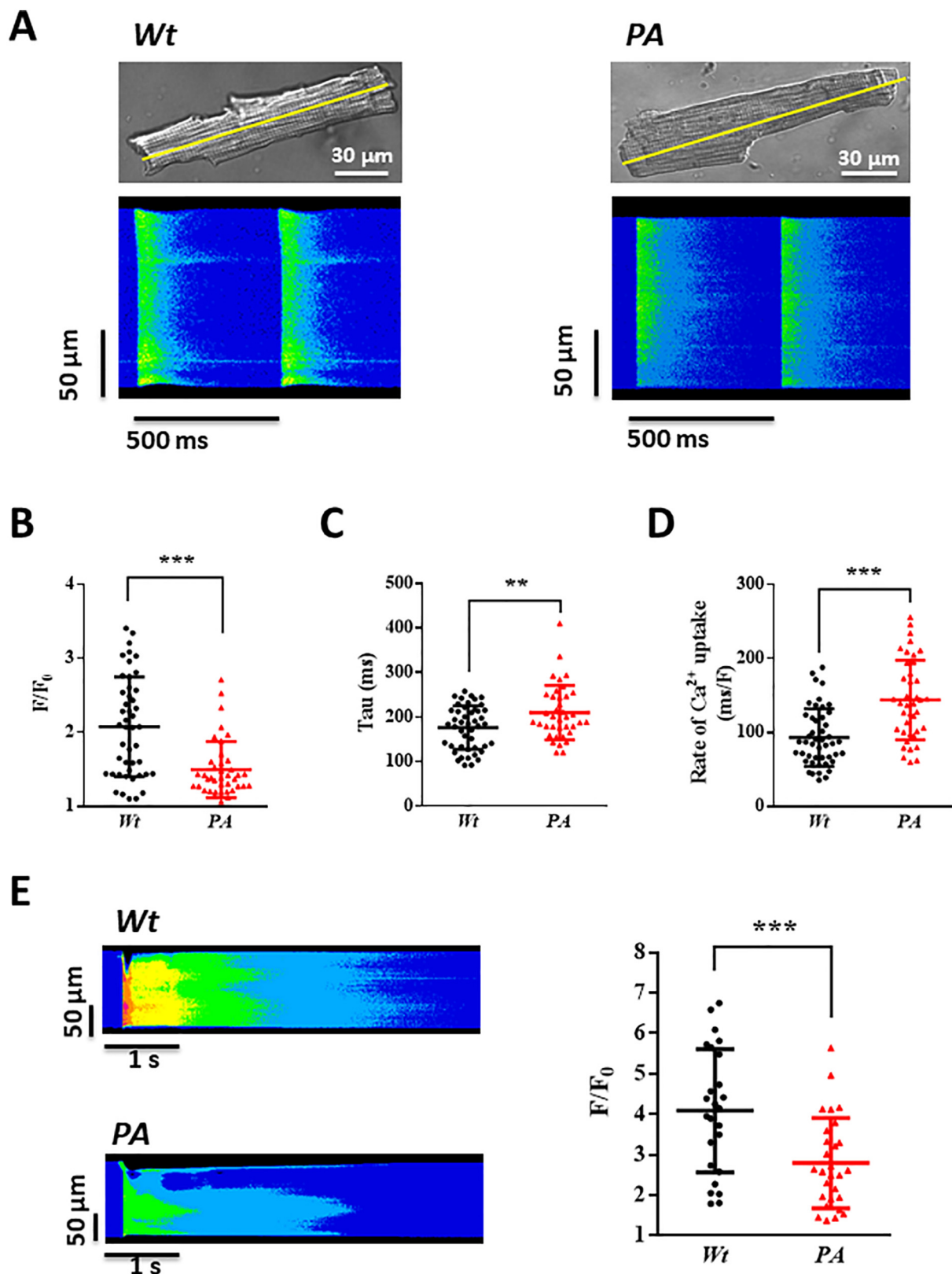
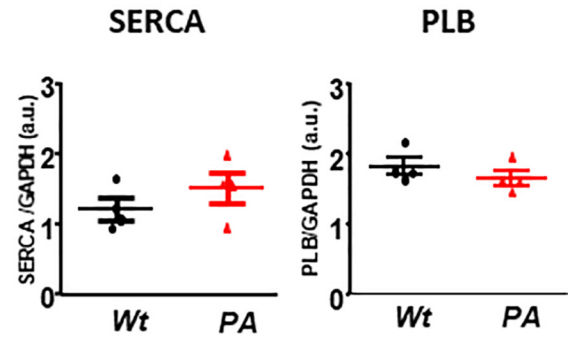
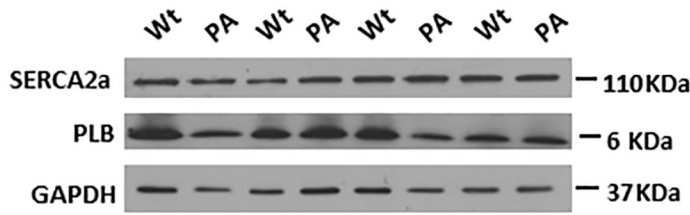
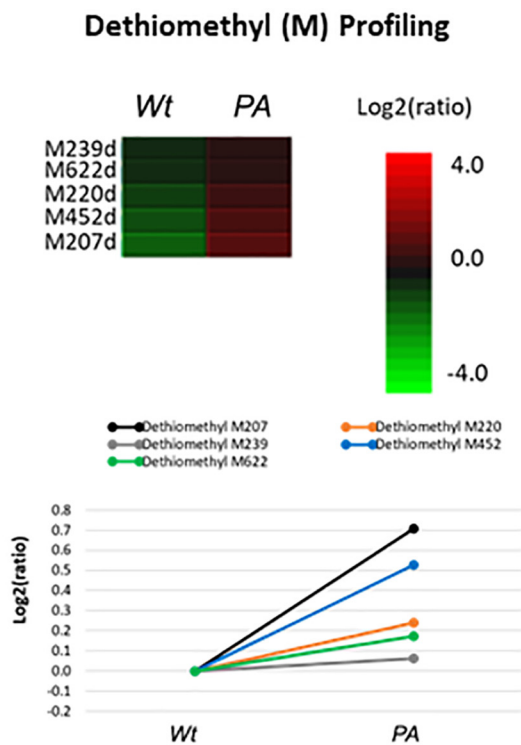
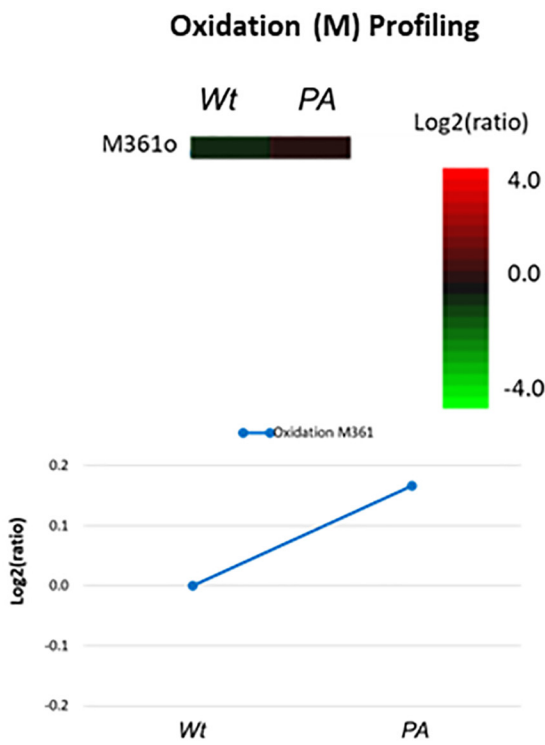


Fig. 2. Hypomorphic *Pcca*^{-/-} (A138T) mice have impaired systolic Ca²⁺ release and SR-Ca²⁺ load. **A.** Upper panel illustrates a wild-type (*Wt*) (left panel) and *Pcca*^{-/-} (A138T) (*PA*) (right panel) cardiomyocyte visualized by confocal microscopy (40 \times oil immersion objective). Yellow line indicates the scan range to obtain [Ca²⁺]_i transients. Lower panel shows a representative line-scan confocal images of [Ca²⁺]_i transients obtained in field-stimulated cardiomyocytes (2 Hz) from *Wt* (left panel) and *PA* (right panel) mice. **B–D.** Individual and mean values of peak fluorescence [Ca²⁺]_i transients (F/F_0 , **B**), decay time constant (Tau, **C**) and rate of Ca²⁺ uptake (**D**) in *Wt* ($n = 47/N = 5$) and *PA* ($n = 40/N = 4$) cardiomyocytes. Results show mean values \pm SD $^{**}p < .01$; $^{***}p < .001$ vs *Wt*. **E.** Left panel shows illustrative line-scan confocal images of caffeine-induced [Ca²⁺]_i transients from a *Wt* (upper panel) and a *PA* (lower panel) cardiomyocyte. Right panel shows the individual and mean values of the amplitude of the caffeine-induced [Ca²⁺]_i transients (F/F_0) obtained in *Wt* ($n = 28/N = 5$) and *PA* ($n = 25/N = 4$) cells. Results show mean values \pm SD. $^{***}p < .001$ vs *Wt*. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

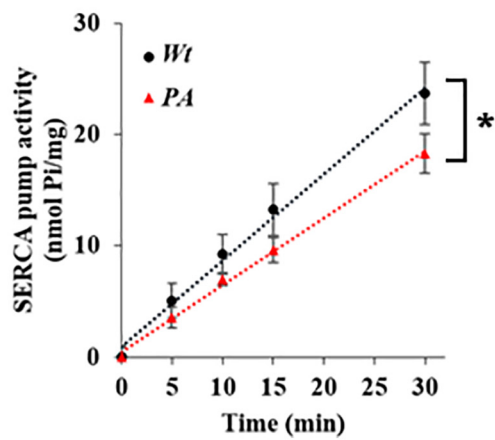
A



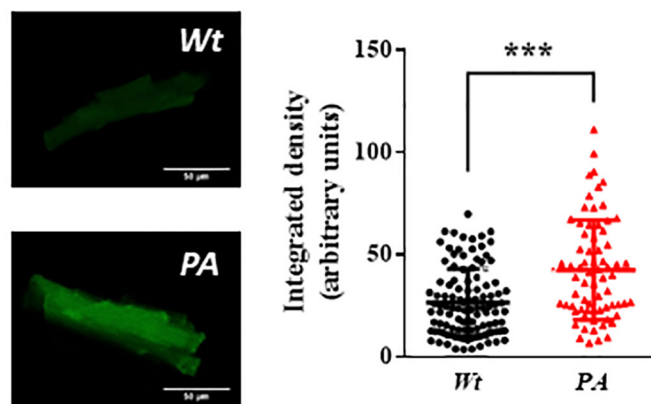
B



C



D



(caption on next page)

Fig. 3. Cardiomyocytes/hearts from hypomorphic *Pcca*^{-/-} (A138T) mice have similar SERCA2a and PLB protein levels, depressed activity of SERCA2a, enhanced oxidation and increased ROS levels to wild-type mice. A. Left panel, representative Western blots of SERCA2a, PLB and GAPDH obtained from heart lysates of wild-type (*Wt*) (*N* = 4) and *Pcca*^{-/-} (A138T) (*PA*) (*N* = 4) mice. Right panel shows scatter plots summarizing the data in both cases; mean \pm SD (band ratio) expressed as arbitrary units. B. The relative peptide abundance is represented as a heat map (upper panels) of the representative peptides in each condition. The algorithm measures the log₂ ratios of the abundance of each peptide relative to the average abundance. Variation trend charts (lower panels) display the expression level of the selected peptide in the different conditions. C. Graph shows SERCA2a pump ATPase activity derived by fitting time course obtained in *Wt* (*N* = 4) and *PA* (*N* = 5) cardiac samples. D. Example of a *Wt* and *PA* cardiomyocyte loaded with H₂DCFDA. Scatter plots illustrate the individual and mean values of the fluorescence using confocal microscopy (40 \times) in *Wt* (*n* = 113/*N* = 4) and *PA* (*n* = 73/*N* = 4) and expressed as arbitrary units. Mean \pm SD *** *p* < .001 vs *Wt*.

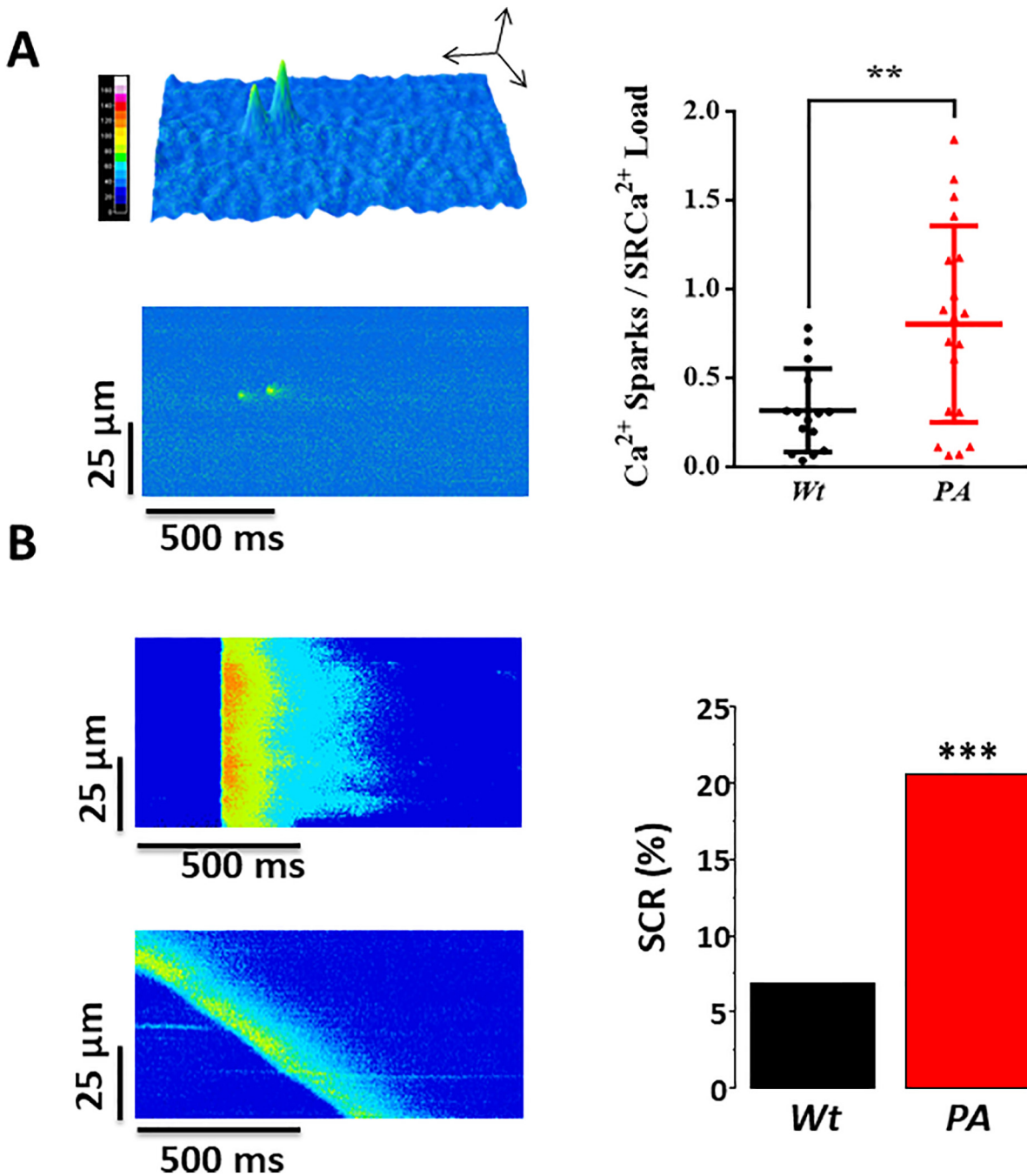
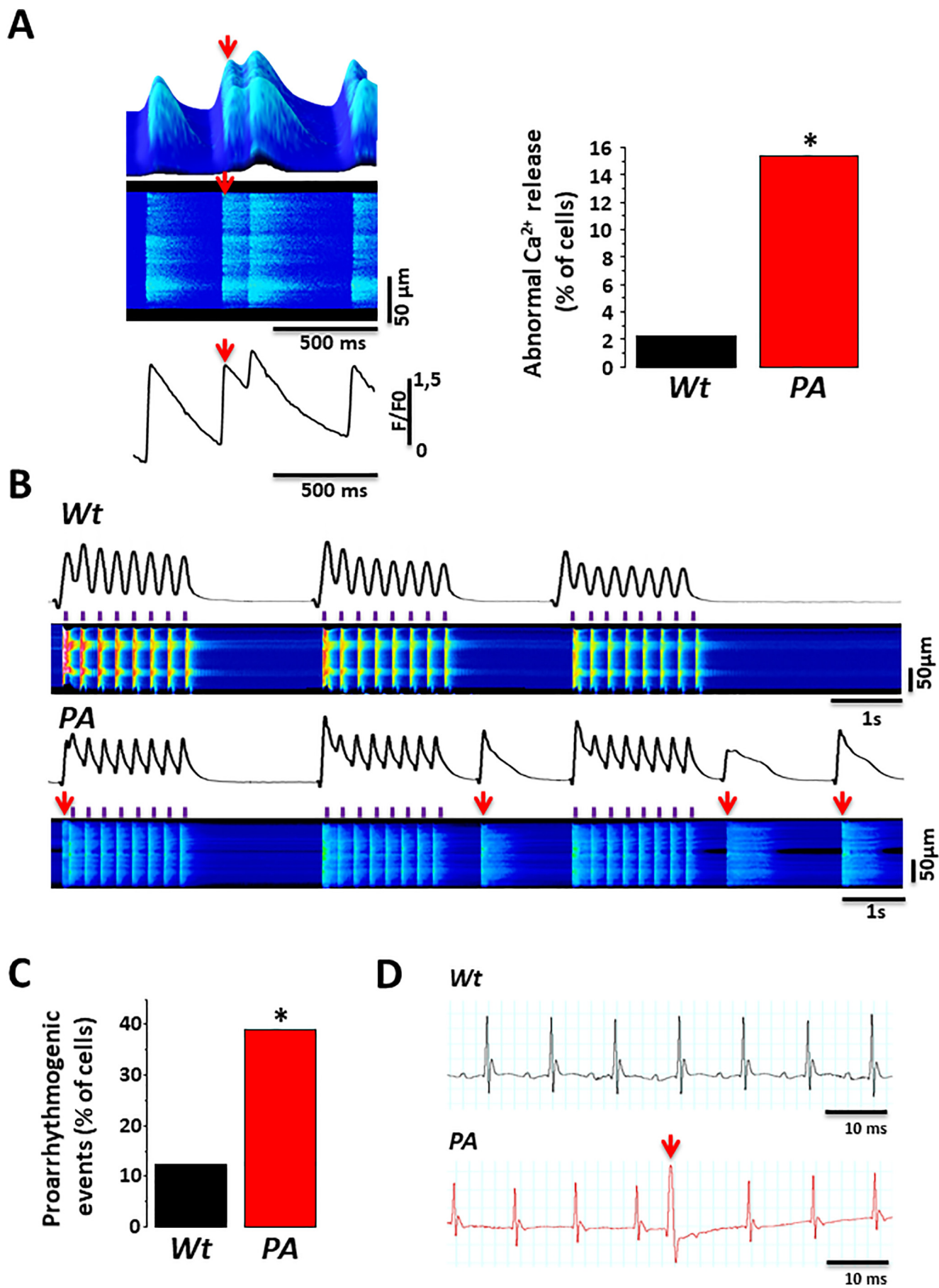


Fig. 4. Spontaneous Ca²⁺ release is increased in hypomorphic *Pcca*^{-/-} (A138T) mice. A. Left panel shows illustrative 3D- and 2D-line-scan confocal images of Ca²⁺ sparks recordings acquired in a quiescent wild-type (*Wt*) cardiomyocyte. Right panel shows the individual and mean values of normalized Ca²⁺ spark frequency by SR Ca²⁺ load in *Wt* and *Pcca*^{-/-} (A138T) (*PA*) cardiomyocytes. B. Left panel shows representative line-scan confocal images of spontaneous diastolic Ca²⁺ release (SCR) recordings (spontaneous [Ca²⁺]_i; transients release [upper panel] and Ca²⁺ wave [lower panel]) from *PA* cardiomyocytes. Right panel showed SCR occurrence in cardiomyocytes isolated from *Wt* (*n* = 31/*N* = 4) and *PA* (*n* = 39/*N* = 4) mice. Data show mean values \pm SD. ***p* < .01; ****p* < .001 vs *Wt*.



(caption on next page)

Fig. 5. *Pcca*^{-/-} (A138T) mice show pro-arrhythmogenic Ca²⁺ events and spontaneous premature ventricular beats. A. Left panel shows a 3D (upper panel) and 2D (medium panel) illustrative line scan images of a *Pcca*^{-/-} (A138T) (*PA*) cardiomyocyte paced at 2 Hz. Lower panel illustrates the corresponding trace of fluorescence obtained. Arrow indicates the beginning of an abnormal Ca²⁺ release. Right panel shows the percentage of cells with abnormal Ca²⁺ release: *Wt* (*n* = 32/*N* = 4) and *PA* (*n* = 39/*N* = 4). B. Representative line-scan images of *Wt* (upper panel) and *PA* (lower panel) cardiomyocyte paced at 2 Hz for 3 cycles isolated. The corresponding fluorescence [Ca²⁺]_i transients profiles appear below line-scan images. Purple marks indicate electrical stimulation. C. Percentage of cardiomyocytes with pro-arrhythmogenic events: *Wt* (*n* = 32/*N* = 4) and *PA* (*n* = 41/*N* = 4). **p* < .05 vs *Wt*. D. Representative ECG traces obtained in a *Wt* mouse (upper panel, black trace) and a *PA* mouse (lower panel, red trace). Arrow indicates a spontaneous premature beat. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

indicated a higher number of cells with SCR in the *PA* group than in the *Wt* group (20.5% versus 6.9%, respectively; *p* < .001; Fig. 4B). By contrast, no changes in the amplitude of SCR were observed (Supplementary Fig. 6). Next, we determined by proteomic analysis whether functional changes of RyR2 in *PA* were related to changes in its oxidative state. Results of this analysis did not uncover any post-translational modification related to oxidized methionines or cysteines residues of RyR2 in *PA* cardiomyocytes when compared to *Wt* cells (data not shown).

During the recording of [Ca²⁺]_i transients, we observed that 15.4% of *PA* cells showed abnormal [Ca²⁺]_i release, while these events were detected in only 2.4% of *Wt* cardiomyocytes (*p* < .05; Fig. 5A). To gain further insight into this phenomenon, we employed a protocol (3-field stimulated trains at 2 Hz) to search for possible proarrhythmogenic events in isolated cardiomyocytes. The upper panel of Fig. 5B illustrates an example of regular [Ca²⁺]_i transients obtained in a *Wt* cell, whereas the lower panel shows proarrhythmogenic Ca²⁺ release in a *PA* cell. The percentage of cells presenting these events was significantly higher in *PA* cells than in *Wt* cardiomyocytes (*p* < .05; Fig. 5C).

Finally, ECG analysis was employed to determine whether these mechanisms detected in isolated cardiomyocytes were related to impairment in the cardiac rhythm of *PA* mice. We found that 40% of *PA* mice showed spontaneous premature ventricular beats, whereas none of *Wt* mice presented with this abnormal behavior (Fig. 5D).

4. Discussion

The present study provides the first evidence for impaired Ca²⁺ handling as a potential pathological mechanism in the cardiac dysfunction and ventricular arrhythmias associated with *PA*.

A significant number of *PA* patients develop cardiac complications that are not related to disease severity [6,7,11], but their presence is a significant factor for the rapid deterioration and death of these individuals. While the mechanisms involved in the development of cardiac disorders associated with this rare disease are largely unknown, a widely accepted hypothesis is that mitochondrial dysfunction, resulting in impairment of energy metabolism and oxidative stress, contributes to the compromised myocardial function [6,9,14,40]. It is clear that additional mechanisms likely operate in the progression of cardiac dysfunction in *PA*, as these changes are mainly absent in other related organic acidemias with documented mitochondrial dysfunction and excessive ROS production [41]. For example, there might be a direct toxic effect from specific accumulating metabolites (e.g., propionyl-CoA, 2-methylcitrate and odd-numbered long chain fatty acids) acting synergistically to alter anaplerotic substrate availability and to impair normal contractility of cardiac muscle [42]. In addition, propionate is a known histone deacetylase inhibitor [43], and cardiac remodeling has been linked to histone acetylation [44]. In support of the toxic metabolite hypothesis, it is worth noting that liver transplantation, which effectively reduces the levels of circulating propionate metabolites, may reverse *PA*-associated cardiomyopathy in some patients [42]. However, cardiomyopathy may develop in patients with *PA* under good metabolic control, and therefore other mechanisms must be involved, perhaps related to subtle cardiac metabolic changes inducing specific signaling pathways. Here we used the *Pcca*^{-/-} (A138T) hypomorphic *PA* mouse model, which recapitulates the metabolic phenotype observed in

patients with *PA* [17,45], to examine for possible cardiac abnormalities. Our study shows that nearly 60% of *PA* mice show significant systolic depression. Cardiac dysfunction in *PA* mice was also associated with an impairment in the EC coupling. Indeed, the lack of changes in the sarcolemma I_{CaL} of *PA* cardiomyocytes indicates that the lower [Ca²⁺]_i transients observed in these cells can be related to SR-Ca²⁺ depletion. Accordingly, diminished SR-Ca²⁺ load impaired systolic Ca²⁺ release and promoted the deficient activation of myofilaments, leading to impaired cell contraction. A defect in SR-Ca²⁺ re-uptake is a plausible explanation for these findings. In this regard, the decay time of [Ca²⁺]_i transients was significantly slower in the *PA* group than in the *Wt* group, indicating a slower SERCA2a-dependent SR-Ca²⁺ re-uptake. Moreover, when the cell stimulation rate increased, SR-Ca²⁺ uptake worsened, pointing to a clear impairment of SERCA2a function. Corroborating these data was the finding that *k* SERCA2a and its hydrolytic activity were also decreased in the *PA* group compared to *Wt*.

SERCA2a is the main SR-Ca²⁺ ATPase responsible for SR-Ca²⁺ uptake and its function is highly dependent on cardiomyocyte energetic balance. Under physiological conditions, fatty acids are the preferred fuel substrate in the heart; however, certain cardiovascular diseases such as heart failure show a significant drop in ATP levels due to a decrease in fatty acid oxidation and mitochondrial oxidative activity. Failing hearts try to compensate for this impairment by bolstering glycolysis, but this upregulation is insufficient to counteract the reduction in ATP production, impairing cardiac Ca²⁺ handling [46]. Similar to what is seen in heart failure, *PA* has been associated with an impairment in energy metabolism that triggers glycolysis in cardiomyocytes [14,47]. Thus, *PA*-related changes in the energy metabolism could promote a decrease in available cardiac ATP, hampering SERCA2a activity.

Our results show that protein levels of SERCA2a were comparable in cardiomyocytes from both groups of mice. Decreased activity of SERCA2a in the presence of normal protein expression could be explained by changes in its regulation by PLB, or by post-translational modifications [48] that can interfere with the ATP-binding site, rendering it unable to hydrolyze ATP [49–51]. In this regard, our results showed similar protein cardiac levels of PLB in *Wt* and *PA* groups.

Mitochondrial dysfunction is involved in the development of heart failure [46] and also in the pathophysiology of *PA* [3]. The increase of ROS levels observed in cardiomyocytes from *PA* mice is in good agreement with the increased SERCA2a oxidation rate at specific methionines revealed by proteomic analysis of SERCA2a post-translational modifications. Methionine side chains are highly sensitive to oxidation by ROS and this specific modification of cellular proteins under *in vitro* conditions has been shown to inhibit their function [52–55]. Accordingly, increased ROS levels along with energy deficiency could impair SERCA2a activity and thus depress SR-Ca²⁺ re-uptake, decreasing systolic Ca²⁺ release and impairing cell contractility in *PA*. Analysis of *PA* mice treated with ROS scavengers will be an important next step towards understanding *PA* cardiac pathophysiology.

Related to the functional impairment in the SR-Ca²⁺ load by oxidizing compounds, in an elegant set of experiments Terentyev et al., demonstrated that the administration of 2,2'-dithiodipyridine (an oxidant) to healthy cardiomyocytes induces a decrease in the SR-Ca²⁺ load that can be partially prevented by the addition of the reducing agent dithiothreitol [56]. The authors found that 2,2'-dithiodipyridine

mediates SR-Ca²⁺ depletion by increasing diastolic Ca²⁺ leak. In our study, the proteomic analysis of RyR2 did not show any change in the oxidative state of the channel in PA. However we cannot exclude that other post-translational changes affecting phosphorylation state of RyR2 could be involved in the increased diastolic leak observed in PA.

The depressed SR-Ca²⁺ load detected in PA cardiomyocytes could also be related to impairment in intracellular Ca²⁺ dynamics during diastole [28,39]. Indeed, PA cardiomyocytes showed increased cytosolic Ca²⁺ levels at rest, represented by augmented basal fluorescence (F0) values. Importantly, increased diastolic Ca²⁺ overload can amplify the diastolic Ca²⁺ leak through the sensitization of RyR2. Under physiological conditions, RyR2-mediated Ca²⁺ release is almost absent during diastole because the RyR2 channels are mainly closed. In cardiac disease, abnormally increased diastolic Ca²⁺ release due to Ca²⁺ sparks, Ca²⁺ waves or SCR, can provoke Ca²⁺ extrusion from the cell via NCX activity, promoting the entry of Na⁺ and depolarizing the cell during diastole to trigger an action potential and initiate ventricular arrhythmias. Similar events could be occurring in PA mice hearts in which we have observed an increase in Ca²⁺ sparks, Ca²⁺ waves and spontaneous [Ca²⁺]_i transients.

Our results revealed that 40% of PA mice showed spontaneous premature ventricular beats, whereas none of the Wt mice showed these aberrant events. Importantly, Baumgartner et al., have described similar ectopic ventricular beats in patients with PA [9]. These rhythm disturbances are closely related to impairment in the intracellular Ca²⁺ release and can be explained by the increased occurrence of pro-arrhythmogenic Ca²⁺ release in PA cardiomyocytes [57,58]. Thus, aberrant Ca²⁺ release, along with the increased incidence of Ca²⁺ sparks and Ca²⁺ waves could generate ventricular arrhythmias in PA mice, as mentioned earlier. It is worth noting that the increase in pro-arrhythmic events in PA mice could be in part explained by the enhanced ROS levels associated with this disease, since oxidative stress can promote early after-depolarizations and increase the frequency of spontaneous Ca²⁺ waves, leading to ventricular arrhythmias [57,58]. Other phenotypes of cardiac arrhythmias have been described in PA patients, such as conduction problems, bradycardia, tachycardia or long QT [4,14]. ECG analysis of hypomorphic PA mice failed to show any of these types of arrhythmias, including long QT (Table 1).

In conclusion, our results reveal intracellular Ca²⁺ mishandling as a new pathological mechanism involved in cardiac dysfunction and arrhythmias associated with PA. Redox-modified Ca²⁺ handling can contribute to the disease progression, emerging as a novel therapeutic target in PA patients with depressed cardiac function and ventricular arrhythmias.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

The technical assistance of Isabel Manso, Monica Martin-Belinchón, Lucía Guerrero-Lopez and Elena Montalvo is gratefully acknowledged. The authors thank Dr. Angelica Rueda for her excellent assistance in SERCA2a activity measurement, and the Proteomics Core Facility of Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM, Madrid, Spain) that belongs to ProteoRed, PRB3-ISCI, supported by grant PI17/0019. This work was supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and European Regional Development Fund (SAF2016-76004-R, SAF2017-84777-R and PGC2018-097019-B-I00), Instituto de Salud Carlos III (ISCI) (PI17/01093, PI17/01344 and IPT17/0019 - ISCI-SGFI/ERDF, ProteoRed), European Regional Development Fund (FEDER), FSE, the Fundació Marató TV3 (grant 122/C/2015) and CIBERER and CIBER-CV, networks funded by ISCI. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa receives an institutional

grant from Fundación Ramón Areces. The CNIC is supported by ISCI, Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (MCIU) and the Pro CNIC Foundation, and is a Severo Ochoa Center of Excellence (SEV-2015-0505). MF-V is Miguel Servet II researcher of ISCI (MSI16/00047 Carlos III Health Institute). GR-H is Miguel Servet I researcher of ISCI (CP15/00129 Carlos III Health Institute). MT is a PhD student funded by the FPU program of MCIU (FPU17/06135). AFC is a PhD student funded by the FPI-UAM program.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165586>.

References

- [1] B. Guertl, C. Noehammer, G. Hoefler, Metabolic cardiomyopathies, *Int. J. Exp. Pathol.* 81 (2000) 349–372.
- [2] 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 Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, 2001, pp. 2165–2193.
- [3] E. Richard, B. Perez, C. Perez-Cerda, L.R. Desviat, Understanding molecular mechanisms in propionic acidemia and investigated therapeutic strategies, *Expert Opinion on Orphan Drugs* 3 (2015) 1427–1438.
- [4] A.F. Massoud, J.V. Leonard, Cardiomyopathy in propionic acidemia, *Eur. J. Pediatr.* 152 (1993) 441–445.
- [5] M.R. Baumgartner, F. Horster, C. Dionisi-Vici, G. Haliloglu, D. Karall, K.A. Chapman, M. Huemer, M. Hochuli, M. Assoun, D. Ballhausen, A. Burlina, B. Fowler, S.C. Grunert, S. Grunewald, T. Honzik, B. Merinero, C. Perez-Cerda, S. Scholl-Burgi, F. Skovby, F. Wijburg, A. MacDonald, D. Martinelli, J.O. Sass, V. Valayannopoulos, A. Chakrapani, Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic acidemia, *Orphanet J Rare Dis* 9 (2014) 130.
- [6] J. Baruteau, I. Hargreaves, S. Krywawych, A. Chalasani, J.M. Land, J.E. Davison, M.K. Kwok, G. Christov, A. Karimova, M. Ashworth, G. Anderson, H. Prunty, S. Rahman, S. Grunewald, Successful reversal of propionic acidemia associated cardiomyopathy: evidence for low myocardial coenzyme Q10 status and secondary mitochondrial dysfunction as an underlying pathophysiological mechanism, *Mitochondrion* 17 (2014) 150–156.
- [7] S. Iwashima, T. Ishikawa, T. Ohzeki, Y. Endou, Delayed enhancement cardiac magnetic resonance imaging in propionic acidemia, *Pediatr. Cardiol.* 31 (2010) 884–886.
- [8] L. Pena, B.K. Burton, Survey of health status and complications among propionic acidemia patients, *Am. J. Med. Genet. A* 158A (2012) 1641–1646.
- [9] D. Baumgartner, S. Scholl-Burgi, J.O. Sass, W. Sperl, U. Schweigmann, J.I. Stein, D. Karall, Prolonged QTc intervals and decreased left ventricular contractility in patients with propionic acidemia, *J. Pediatr.* 150 192–197 (197) (2007) e191.
- [10] K. Ameloot, D. Vlasselaers, M. Dupont, W. Meersseman, L. Desmet, J. Vanhaecke, N. Vermeer, B. Meyns, J. Pirenne, D. Cassiman, C. De Laet, P. Goyens, S.G. Malekzadeh-Milan, D. Biarent, A. Meulemans, F.G. Debray, Left ventricular assist device as bridge to liver transplantation in a patient with propionic acidemia and cardiogenic shock, *J. Pediatr.* 158 (2011) 866–867.
- [11] O.A. Shchelochkov, N. Carrillo, C. Venditti, A.H. Adam, Pagon R.A. MP, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya (Eds.), *Propionic Acidemia*, GeneReviews, Seattle, 1993(Update 2016).
- [12] M. Riemersma, M.R. Hazebroek, A. Helderman-van den Enden, G.S. Salomons, S. Ferdinandusse, M. Brouwers, L. van der Ploeg, S. Heymans, J.F.C. Glatz, A. van den Wijngaard, I.P.C. Krapels, J. Bierau, H.G. Brunner, Propionic acidemia as a cause of adult-onset dilated cardiomyopathy, *Eur. J. Hum. Genet.* 25 (2017) 1195–1201.
- [13] K. Mizuguchi, H. Hoshino, T. Nagasawa, M. Kubota, Extracorporeal membrane oxygenation in a patient with propionic acidemia: a therapeutic option for cardiac failure, *J. Inher. Metab. Dis.* 32 (Suppl. 1) (2009) S37–S40.
- [14] R. Mardach, M.A. Verity, S.D. Cederbaum, Clinical, pathological, and biochemical studies in a patient with propionic acidemia and fatal cardiomyopathy, *Mol. Genet. Metab.* 85 (2005) 286–290.
- [15] A. Laemmle, C. Balmer, C. Doell, J.O. Sass, J. Haberle, M.R. Baumgartner, Propionic acidemia in a previously healthy adolescent with acute onset of dilated cardiomyopathy, *Eur. J. Pediatr.* 173 (2014) 971–974.
- [16] C. Arrizza, A. De Gottardi, E. Foglia, M. Baumgartner, M. Gautschi, J.M. Nuoffer, Reversal of cardiomyopathy in propionic acidemia after liver transplantation: a 10-year follow-up, *Transpl. Int.* 28 (2015) 1447–1450.
- [17] 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.
- [18] C. Perez-Cerda, B. Merinero, P. Rodriguez-Pombo, B. Perez, L.R. Desviat, S. Muro, E. Richard, M.J. Garcia, J. Gangoiti, P. Ruiz Sala, P. Sanz, P. Briones, A. Ribes, M. Martinez-Pardo, J. Campistol, M. Perez, R. Lama, M.L. Murga, T. Lema-Garrett, A. Verdu, M. Ugarte, Potential relationship between genotype and clinical outcome in propionic acidemia patients, *Eur. J. Hum. Genet.* 8 (2000) 187–194.

- [19] 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.
- [20] 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. Inherit. Metab. Dis.* 36 (2013) 731–740.
- [21] 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.
- [22] A.V. Zima, L.A. Blatter, Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters, *Cardiovasc. Res.* 71 (2006) 310–321.
- [23] I.A. Hobai, E.S. Buys, J.C. Morse, J. Edgecomb, E.H. Weiss, A.A. Armoundas, X. Hou, A.R. Khandelwal, D.A. Siwik, P. Brouckaert, R.A. Cohen, W.S. Colucci, SERCA Cys674 sulphonylation and inhibition of L-type Ca^{2+} influx contribute to cardiac dysfunction in endotoxemic mice, independent of cGMP synthesis, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305 (2013) H1189–H1200.
- [24] D.M. Bers, Cardiac excitation-contraction coupling, *Nature* 415 (2002) 198–205.
- [25] L. Li, G. Chu, E.G. Kranias, D.M. Bers, Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects, *Am. J. Phys.* 274 (1998) H1335–H1347.
- [26] D.M. Bers, Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes, *Annu. Rev. Physiol.* 70 (2008) 23–49.
- [27] W.G. Wier, H.E. ter Keurs, E. Marban, W.D. Gao, C.W. Balke, Ca^{2+} ‘sparks’ and waves in intact ventricular muscle resolved by confocal imaging, *Circ. Res.* 81 (1997) 462–469.
- [28] A. Val-Blasco, M. Piedras, G. Ruiz-Hurtado, N. Suarez, P. Prieto, S. Gonzalez-Ramos, N. Gomez-Hurtado, C. Delgado, L. Pereira, G. Benito, C. Zaragoza, N. Domenech, M.G. Crespo-Leiro, D. Vasquez-Echeverri, G. Nunez, E. Lopez-Collazo, L. Bosca, M. Fernandez-Velasco, Role of NOD1 in heart failure progression via regulation of $Ca(2+)$ handling, *J. Am. Coll. Cardiol.* 69 (2017) 423–433.
- [29] A. Val-Blasco, J.A. Navarro-Garcia, M. Tamayo, M.J. Piedras, P. Prieto, C. Delgado, G. Ruiz-Hurtado, L. Rozas-Romero, M. Gil-Fernandez, C. Zaragoza, L. Bosca, M. Fernandez-Velasco, Deficiency of NOD1 improves the beta-adrenergic modulation of $Ca(2+)$ handling in a mouse model of heart failure, *Front. Physiol.* 9 (2018) 702.
- [30] A.M. Gomez, H.H. Valdivia, H. Cheng, M.R. Lederer, L.F. Santana, M.B. Cannell, S.A. McCune, R.A. Altschuld, W.J. Lederer, Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure, *Science* 276 (1997) 800–806.
- [31] L.L. Torres, A. Cantero, M. del Valle, A. Marina, F. Lopez-Gallego, J.M. Guisan, J. Berenguer, A. Hidalgo, Engineering the substrate specificity of a thermophilic penicillin acylase from *thermus thermophilus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013) 1555–1562.
- [32] T. Kocher, P. Pichler, M. Schutzbier, C. Stingl, A. Kaul, N. Teucher, G. Hasenfuss, J.M. Penninger, K. Mechtler, High precision quantitative proteomics using iTRAQ on an LTQ Orbitrap: a new mass spectrometric method combining the benefits of all, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 4743–4752.
- [33] R. Alonso, D. Pisa, A.I. Marina, E. Morato, A. Rabano, I. Rodal, L. Carrasco, Evidence for fungal infection in cerebrospinal fluid and brain tissue from patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Int. J. Biol. Sci.* 11 (2015) 546–558.
- [34] S. Martinez-Bartolome, P. Navarro, F. Martin-Maroto, D. Lopez-Ferrer, A. Ramos-Fernandez, M. Villar, J.P. Garcia-Ruiz, J. Vazquez, Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method, *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008) 1135–1145.
- [35] P. Navarro, J. Vazquez, A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 1792–1796.
- [36] E. Bonzon-Kulichenko, F. Garcia-Marques, M. Trevisan-Herraz, J. Vazquez, Revisiting peptide identification by high-accuracy mass spectrometry: problems associated with the use of narrow mass precursor windows, *J. Proteome Res.* 14 (2015) 700–710.
- [37] G. Bartolommei, M.R. Moncelli, F. Tadini-Buoninsegni, A method to measure hydrolytic activity of adenosinetriphosphatases (ATPases), *PLoS One* 8 (2013) e58615.
- [38] E.F. Bode, S.J. Briston, C.L. Overend, S.C. O'Neill, A.W. Trafford, D.A. Eisner, Changes of SERCA activity have only modest effects on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in rat ventricular myocytes, *J. Physiol.* 589 (2011) 4723–4729.
- [39] C. Delgado, G. Ruiz-Hurtado, N. Gomez-Hurtado, S. Gonzalez-Ramos, A. Rueda, G. Benito, P. Prieto, C. Zaragoza, E.G. Delicado, R. Perez-Sen, M.T. Miras-Portugal, G. Nunez, L. Bosca, M. Fernandez-Velasco, NOD1, a new player in cardiac function and calcium handling, *Cardiovasc. Res.* 106 (2015) 375–386.
- [40] K. Fragaki, A. Cano, J.F. Benoist, O. Rigal, A. Chaussonot, C. Rouzier, S. Bannwarth, C. Caruba, B. Chabrol, V. Paquis-Fluckinger, Fatal heart failure associated with CoQ10 and multiple OXPHOS deficiency in a child with propionic acidemia, *Mitochondrion* 11 (2011) 533–536.
- [41] H.A. Hajjes, J.J.M. Jans, S.Y. Tas, N.M. Verhoeven-Duijf, P.M. van Hasselt, Pathophysiology of propionic and methylmalonic acidemias. Part 1: complications, *J. Inherit. Metab. Dis.* 42 (2019) 730–744.
- [42] S. Romano, V. Valayannopoulos, G. Touati, J.P. Jais, D. Rabier, Y. de Keyser, D. Bonnet, P. de Lonlay, Cardiomyopathies in propionic aciduria are reversible after liver transplantation, *J. Pediatr.* 156 (2010) 128–134.
- [43] L.G. Silva, B.S. Ferguson, A.S. Avila, A.P. Faciola, 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.* 96 (2018) 5244–5252.
- [44] R.A. Bagchi, K.L. Weeks, Histone deacetylases in cardiovascular and metabolic diseases, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 130 (2019) 151–159.
- [45] A. Rivera-Barahona, E. Alonso-Barroso, B. Perez, M.P. Murphy, E. Richard, L.R. Desviat, Treatment with antioxidants ameliorates oxidative damage in a mouse model of propionic acidemia, *Mol. Genet. Metab.* 122 (2017) 43–50.
- [46] B. Zhou, R. Tian, Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure, *J. Clin. Invest.* 128 (2018) 3716–3726.
- [47] Y. Wang, B.A. Christopher, K.A. Wilson, D. Muoio, R.W. McGarrah, H. Brunengraber, G.F. Zhang, Propionate-induced changes in cardiac metabolism, notably CoA trapping, are not altered by L-carnitine, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 315 (2018) E622–E633.
- [48] F. Qin, D.A. Siwik, S. Lancel, J. Zhang, G.M. Kuster, I. Luptak, L. Wang, X. Tong, Y.J. Kang, R.A. Cohen, W.S. Colucci, Hydrogen peroxide-mediated SERCA cysteine 674 oxidation contributes to impaired cardiac myocyte relaxation in senescent mouse heart, *J. Am. Heart Assoc.* 2 (2013) e000184.
- [49] K.Y. Xu, J.L. Zweier, L.C. Becker, Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum $Ca(2+)$ -ATPase function by direct attack on the ATP binding site, *Circ. Res.* 80 (1997) 76–81.
- [50] J. Balderas-Villalobos, T. Molina-Munoz, P. Mailloux-Salinas, G. Bravo, K. Carvajal, N.L. Gomez-Viquez, Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305 (2013) H1344–H1353.
- [51] S. Lancel, F. Qin, S.L. Lennon, J. Zhang, X. Tong, M.J. Mazzini, Y.J. Kang, D.A. Siwik, R.A. Cohen, W.S. Colucci, Oxidative posttranslational modifications mediate decreased SERCA activity and myocyte dysfunction in Galphaq-over-expressing mice, *Circ. Res.* 107 (2010) 228–232.
- [52] D. Johnson, J. Travis, The oxidative inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor. Further evidence for methionine at the reactive center, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 4022–4026.
- [53] A. Janoff, H. Carp, D.K. Lee, R.T. Drew, Cigarette smoke inhalation decreases alpha 1-antitrypsin activity in rat lung, *Science* 206 (1979) 1313–1314.
- [54] P. Caldwell, D.C. Luk, H. Weissbach, N. Brot, Oxidation of the methionine residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L12 decreases the protein's biological activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75 (1978) 5349–5352.
- [55] T.C. Squier, D.J. Bigelow, Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis, *Front. Biosci.* 5 (2000) D504–D526.
- [56] D. Terentyev, I. Gyorke, A.E. Belevych, R. Terentyeva, A. Sridhar, Y. Nishijima, E.C. de Blanco, S. Khanna, C.K. Sen, A.J. Cardounel, C.A. Carnes, S. Gyorke, Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in chronic heart failure, *Circ. Res.* 103 (2008) 1466–1472.
- [57] N. Morita, A.A. Sovari, Y. Xie, M.C. Fishbein, W.J. Mandel, A. Garfinkel, S.F. Lin, P.S. Chen, L.H. Xie, F. Chen, Z. Qu, J.N. Weiss, H.S. Karagueuzian, Increased susceptibility of aged hearts to ventricular fibrillation during oxidative stress, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297 (2009) H1594–H1605.
- [58] H.T. Ho, S.C. Stevens, R. Terentyeva, C.A. Carnes, D. Terentyev, S. Gyorke, Arrhythmogenic adverse effects of cardiac glycosides are mediated by redox modification of ryanodine receptors, *J. Physiol.* 589 (2011) 4697–4708.

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*^{-/-} (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 (β -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 β -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; β -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.

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.¹ 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.² 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.³

In inherited metabolic diseases different reports have described an altered miRNA profile in animal models and in patients' samples.² Plasma miRNA levels as biomarkers for disease and treatment response have been described,⁴ as well as modulation of miRNA levels as therapeutic approach.⁵ 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*^{-/-} (A138T).⁶ 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.⁶

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.⁷ 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.^{8,9} 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 β -myosin heavy chain (β -MHC), respectively, biomarkers of cardiac dysfunction.^{6,10} Recently, using this model we have demonstrated the potential role of impaired Ca²⁺ handling in arrhythmias and cardiac dysfunction in PA.¹¹

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*^{-/-} (A138T), were adults (5–8 month-old) in an FVB (susceptible to Friend leukemia virus B) background.¹⁰ 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.¹⁰

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.¹² 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.¹³

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 CO₂ 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, H₂O₂) 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 H₂DCFDA 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 μ L of plasma were used and RNA was eluted in 20 μ 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 N₂ 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 μ 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* (β -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/ μ 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 RT² 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 μ 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/) 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*^{-/-} (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 β -MHC, is elevated at this time point,^{6,10} 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*^{-/-} (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> ^{-/-} (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> ^{-/-} (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.¹⁴ 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 remodeling¹⁵ 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 β -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 κ 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.¹⁶ 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

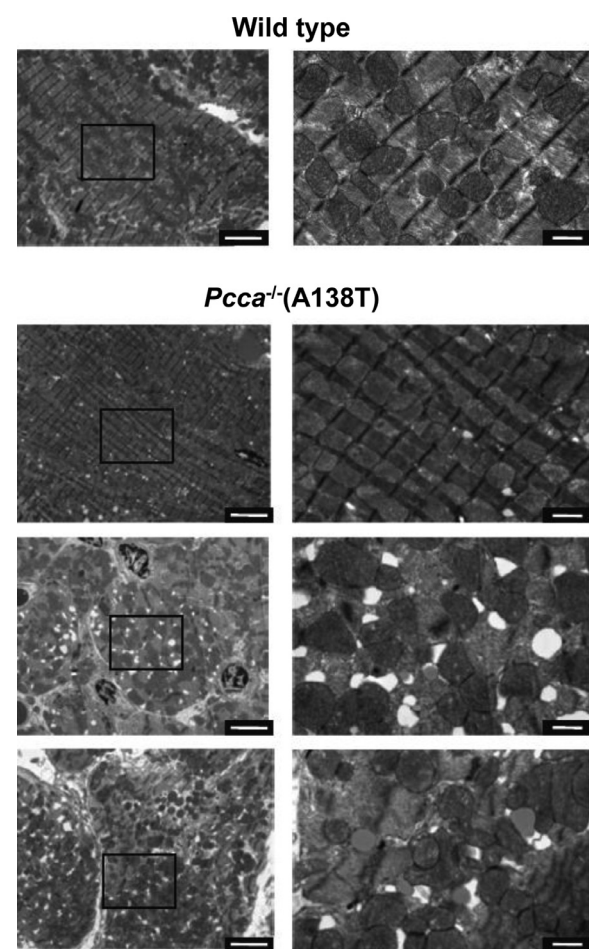


Fig 1. Transmission electron microscopy of cardiac tissue. Heart tissue of wt and PA mice was analyzed by TEM. Panels on the left were viewed at 5,000X magnification, with bars representing 5 μ m. Panels on the right correspond to the image within the boxes shown at 20,000X magnification, with bars representing 1 μ m.

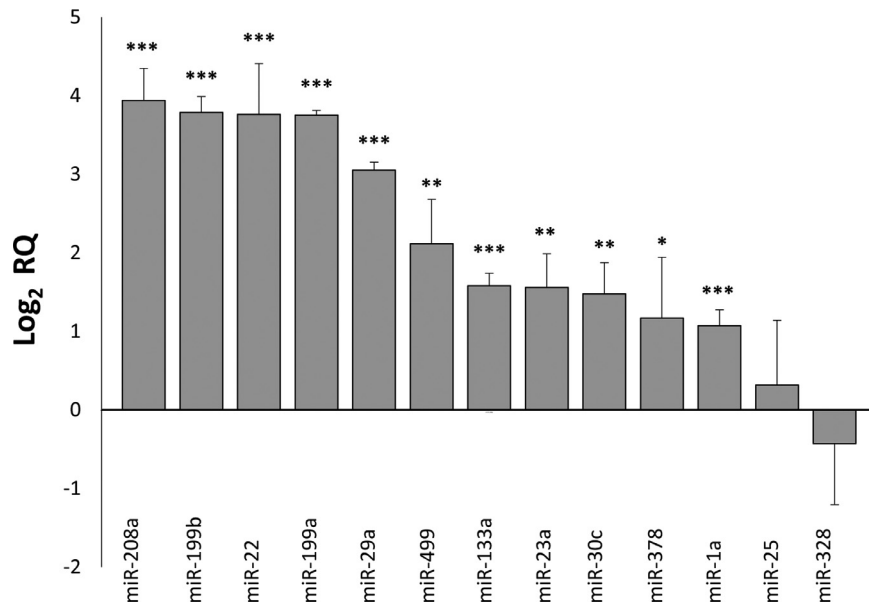


Fig 2. Relative expression analysis of selected miRNAs specifically expressed in cardiac tissue (cardiomiRs). miRNA expression analysis was performed by qRT-PCR in heart samples from wt and PA mice (5 month-old, n=5 per group). Statistical significance was determined by Student's t-test. * $p < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. RQ, relative quantity.

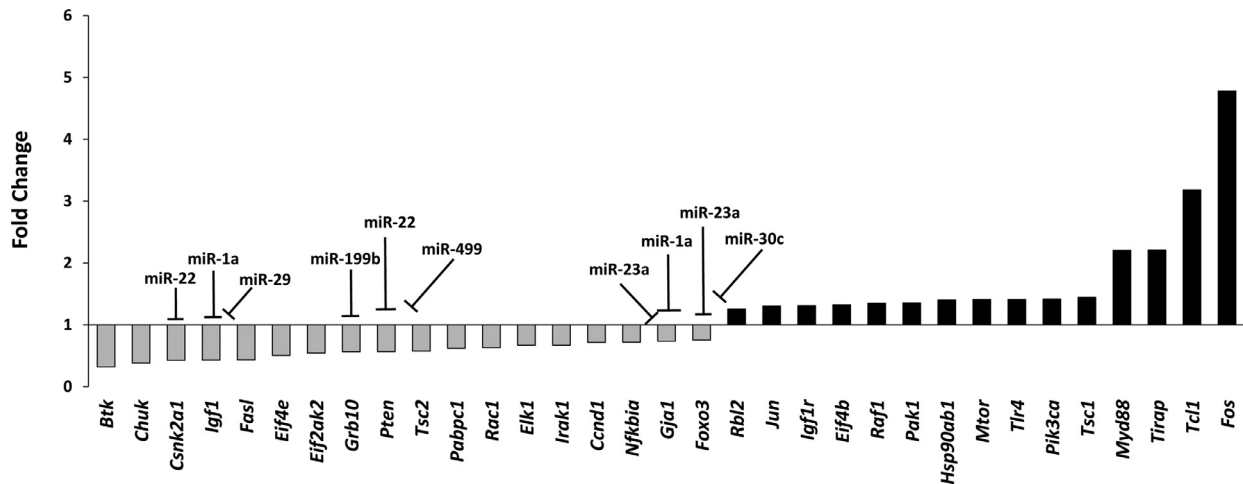


Fig 3. Dysregulated genes in PA mice hearts identified in the expression array of PI3K/Akt signaling pathway. Gene expression analysis was performed by qRT-PCR from cardiac pooled samples of wt and PA mice (5 month-old, n=8 per group). Upregulated miRNAs identified in PA mice hearts are shown above their 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,¹⁷ 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

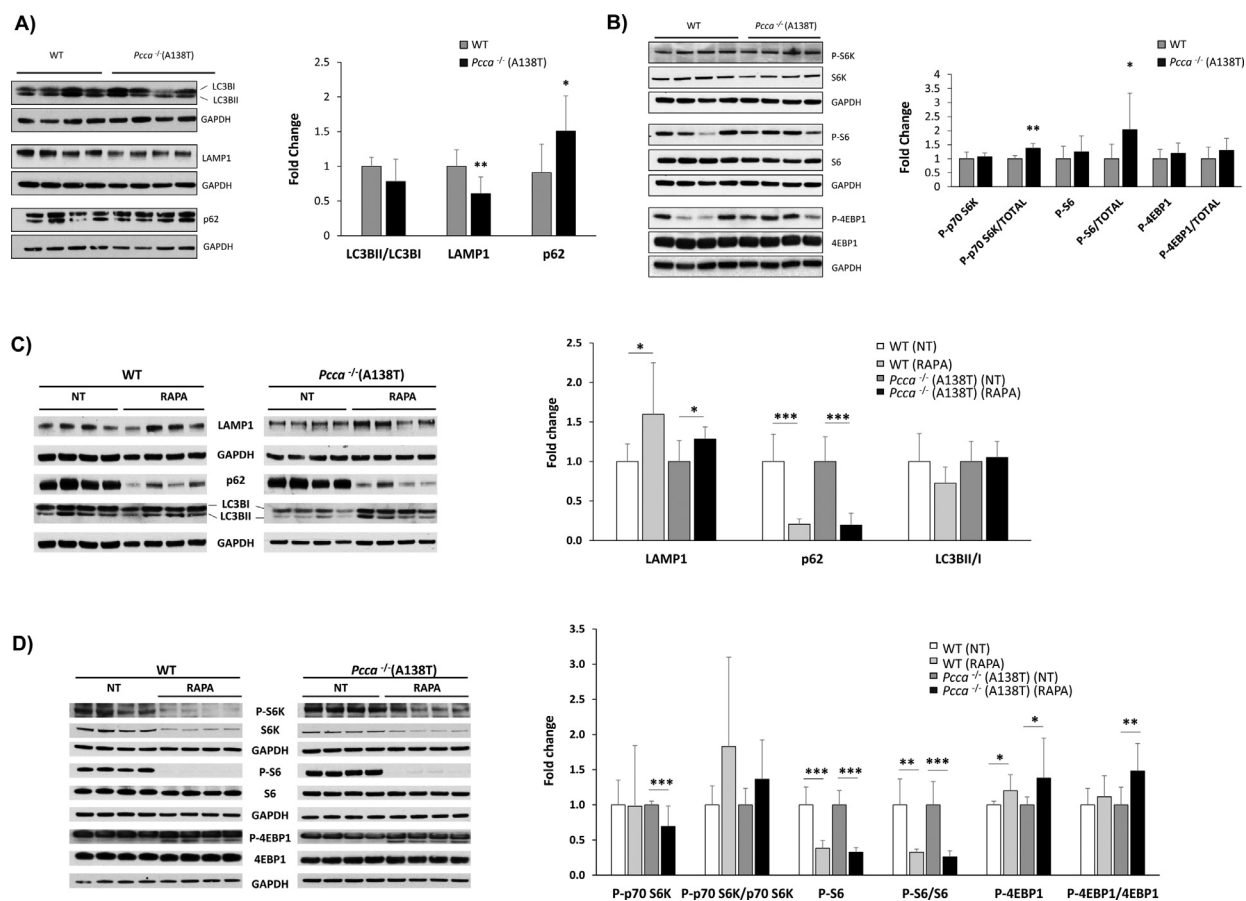


Fig 4. Analysis of protein levels of autophagy and the mTOR related signaling pathways. Heart samples from 5 month-old wt and PA mice (n = 5-10 per group) were analyzed by Western blot. Representative blots are shown on the left and on the right the corresponding quantification by laser densitometry 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 δ (PPAR δ).¹⁸ 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 β -MHC expression in the adult heart.¹⁹ miR-133a represses the expression of caspase 3 and caspase 9 protecting cardiomyocytes from oxidative stress-mediated cell death.¹⁵ 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' plasma²⁰) 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 models⁷ and induced the expression of *Nppb* and *Myh7* (Fig 5, A and B).

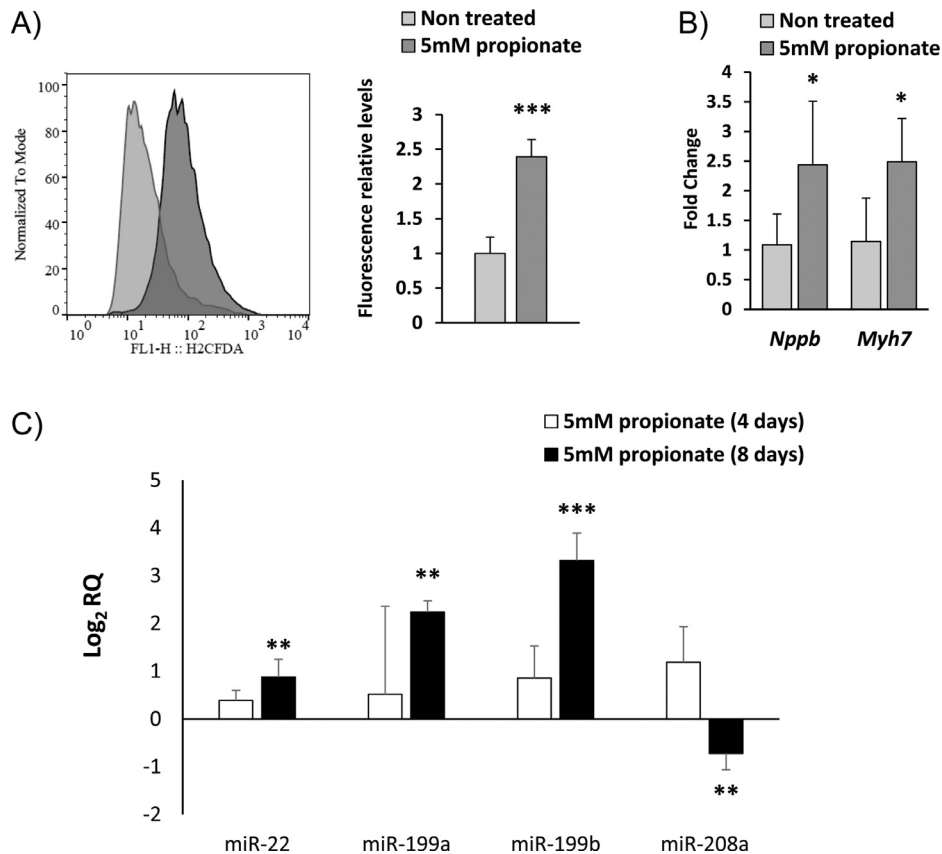


Fig 5. Effect of propionate in the cardiac murine cell line HL-1. Cells were treated with 5mM propionate for 4 days and (A) ROS production was quantified by flow cytometry using the H₂DCFDA probe, (B) expression of cardiac damage markers *Nppb* and *Myh7* were analyzed by qRT-PCR. (C) cardiomiRs (miR-22, 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.^{8,9} 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.²¹ 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.²² 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.^{8,9} 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 Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) function impairing Ca²⁺ handling as a new pathological mechanism involved in PA cardiomyopathy,¹¹ although additional factors are probably involved. There is an unmet clinical need to advance

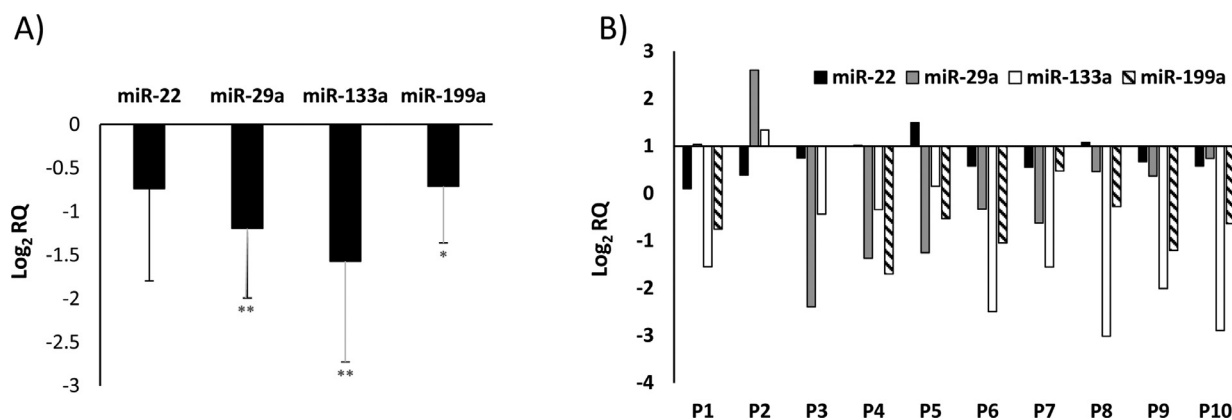


Fig 6. Relative levels of miR-22, miR-29a, miR-133a and miR-199a in plasma samples from PA patients. miRNA relative expression analysis was performed by qRT-PCR. All samples were from PA patients and controls older than 12 years (n = 10 per group). (A) Representation of the mean levels of cardiomiRs 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*^{-/-} (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 δ , 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.²³ 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.²⁴ Propionate is a known histone deacetylase inhibitor²⁵ and cardiac remodeling and hypertrophy has been linked to histone acetylation.²⁶ 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.²⁷ Livers of the hypomorphic PA mouse model display higher levels of H3K14pr which revert to wild-type levels after gene therapy.²⁷ 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.²⁸ In turn, ROS are known to activate signaling kinases and transcription factors, mediate apoptosis and stimulate cardiac fibroblast proliferation leading to cardiac remodeling.²⁹

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 β -MHC (which we find increased in PA mouse hearts), contributing to diminishing cardiac performance.¹⁹ 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.³⁰ Recently, a negative feedback loop between ROS and miR-208a was recently shown in cultured rat cardiomyocytes, with ROS attenuating miR-208a expression,³¹ 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.^{17,18} 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,³² 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,³³ 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.³⁴ 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.³⁵

The presence of dysregulated circulating cardiomiRs in PA patients' samples provides strong evidence of the clinical significance of our study. As in other diseases³⁶ 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,³⁷ 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.³⁸ In addition and as cardiomyopathies may be reversed after liver transplantation in PA patients,³⁹ 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.

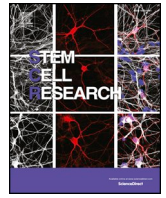
SUPPLEMENTARY MATERIALS

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, Dirckx 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, Facciola 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.



Lab resource: Stem Cell Line

Generation of a gene-corrected human isogenic line (UAMi006-A) from propionic acidemia patient iPSC with an homozygous mutation in the *PCCB* gene using CRISPR/Cas9 technology



Alejandro Fulgencio-Covián^{a,b,c,d}, Mar Álvarez^a, Barry A. Pepers^e, Arístides López-Márquez^{a,f}, Magdalena Ugarte^{b,c,d}, Belén Pérez^{a,b,c,d}, Willeke M.C. van Roon-Mom^e, Lourdes R. Desviat^{a,b,c,d,*}, Eva Richard^{a,b,c,d,*}

^a Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

^b Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM), Madrid, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

^d Instituto de Investigación Sanitaria Hospital La Paz (IdiPaz), ISCIII, Madrid, Spain

^e Department of Human Genetics, LUMC, Leiden, the Netherlands

^f Neuromuscular Unit, Neuropaediatrics Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

A B S T R A C T

Propionic acidemia (PA) is an inherited metabolic disease caused by mutations in the *PCCA* and *PCCB* genes. We have previously generated an induced pluripotent stem cell (iPSC) line (UAMi004-A) from a PA patient with the c.1218_1231del14ins12 (p.Gly407Argfs*14) homozygous mutation in the *PCCB* gene. Here, we report the generation of the isogenic control in which the mutation was genetically corrected using CRISPR/Cas9 technology. Off-target editing presence was excluded and the iPSCs had typical embryonic stem cell-like morphology and normal karyotype that expressed pluripotency markers and maintained their *in vitro* differentiation potential.

1. Resource Table

Unique stem cell lines identifier	UAMi006-A	Name of transgene or resistance	Non applicable
Alternative name of stem cell line	PCCB10-FiPS4F-1-genetically corrected	Inducible/constitutive system	Non applicable
Institution	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, CIBERER, IDIPaz, Madrid, Spain.	Date archived/stock date	May 2020
Contact information of distributor	Eva Richard, erichard@cbm.csic.es	Cell line repository/bank	Spanish National Bank of Cell Lines 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-ips.shtml
Type of cell line	iPSC	Ethical approval	Patient informed consent obtained. Ethics Review Board-competent authority approval obtained (CEI 71-1278)
Origin	Human		
Additional origin info	Age: 24 Sex: Female Ethnicity if known: Caucasian		
Cell Source	Fibroblasts		
Clonality	Clonal		
Method of reprogramming	Sendai Virus		
Genetic modification	Yes		
Type of modification	Gene correction (isogenic control)		
Associated disease	Propionic acidemia		
Gene/locus	<i>PCCB</i> /3q22		
Method of modification	CRISPR/Cas9		

2. Resource utility

Currently, the molecular mechanisms underlying PA progression are not yet fully understood and there is no effective treatment for this disease. This iPSC line represents an ideal control to eliminate genetic background effects that exist between individuals for further mechanistic study and therapy evaluation.

* Corresponding authors at: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa UAM-CSIC, Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma Madrid, 28049 Madrid, Spain.
E-mail addresses: lruiz@cbm.csic.es (L.R. Desviat), erichard@cbm.csic.es (E. Richard).

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102055>

Received 3 August 2020; Received in revised form 14 September 2020; Accepted 12 October 2020

Available online 17 October 2020

1873-5061/ © 2020 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/>).

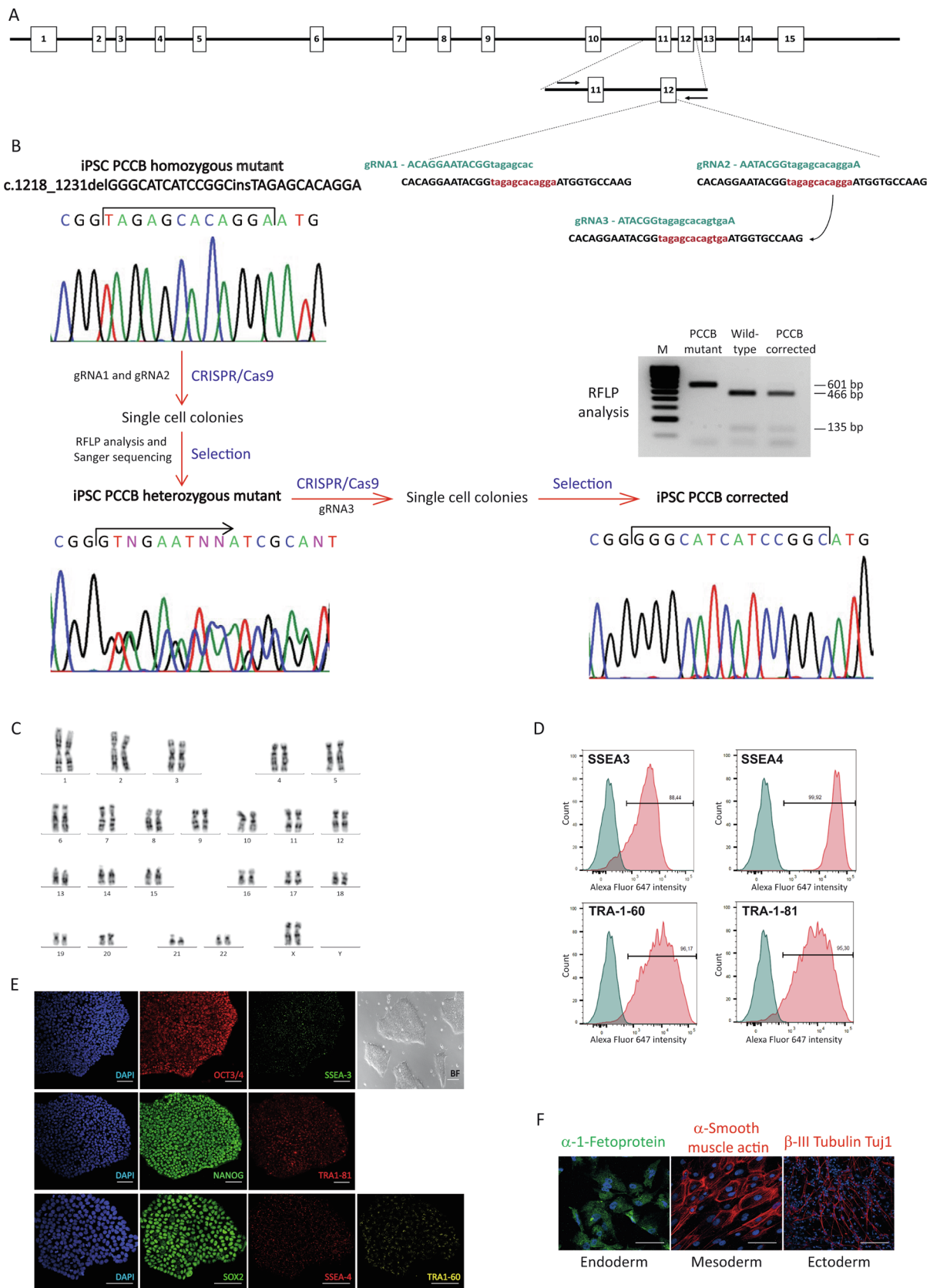


Fig. 1. Characterization of the iPSC line UAMi006-A. A) Specific RNA guides (gRNA 1, 2 and 3) designed in this study. B) Schematic demonstration of the mutation correction workflow. C) Karyotype analysis. D) Flow cytometry analysis for SSEA-3/SSEA-4/TRA-1-60 and TRA-1-81 pluripotency markers. E) Immunofluorescence analysis for OCT4/NANOG/SOX2/SSEA-3/SSEA-4/TRA-1-60 and TRA-1-81 pluripotency markers. F) *In vitro* differentiation analysis by immunofluorescence for α -1 fetoprotein (AFP), α -smooth muscle actin (SMA) and β -III tubulin (TUJ1) proteins.

3. Resource details

Propionic acidemia (PA, MIM#606054, ORPHA:35) is one of the most frequent life-threatening organic acidemias, caused by mutations in either the *PCCA* or *PCCB* genes, encoding both subunits of the mitochondrial propionyl-CoA carboxylase (PCC) enzyme, and is characterized by the toxic accumulation of propionyl-CoA and derived metabolites (Richard et al., 2015). Our group has previously generated two iPSC lines from *PCCA* (UAMi001-A) (Alonso-Barroso et al., 2017) and *PCCB* (UAMi004-A) (López-Márquez et al., 2019) patients to gain a deeper insight into PA pathophysiology and for evaluation of new therapeutic compounds. For that purpose, we aimed to generate the isogenic gene-corrected cell line by gene editing technology with CRISPR/Cas9, using a single-stranded donor template (ssDNA) to replace the *PCCB* homozygous variant, c.1218_1231del14ins12, with the wild-type sequence (Bollen et al., 2018). Specific RNA guides (gRNA 1, 2 and 3) were designed with the help of Breaking-Cas bioinformatic software based on location, editing score and off-targets percentage criteria (Fig. 1A). The off-targets sites presented in this work were selected according to score and genome localization criteria, taking into consideration only those located in intragenic regions. A ssDNA donor template carrying the wild-type sequence and 35 bp homology arms was used to drive the mutation correction. In a first approach, gene editing was performed using guides 1 and 2 and the results from restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay and Sanger sequencing showed a heterozygous editing with guide 2 (Fig. 1B). So, a second round of editing was carried out using a third specific RNA guide (gRNA3). The final correction using gRNA3 was confirmed by RFLP and sequencing analysis (Fig. 1B) and no further mutation was detected in the 4 predicted off-target sites with highest scores after PCR followed by Sanger sequencing (data available with the authors). The gene-corrected UAMi006-A line presented normal hiPSC morphology (Fig. 1E, scale bar: 100 μm) and its karyotype integrity remained normal without detectable aberrations or rearrangements after the gene editing procedure (Fig. 1C). Pluripotency was evaluated by flow cytometry for SSEA-3/SSEA-4/TRA-1-60 and TRA-1-81 (Fig. 1D, Table 1) and by immunofluorescence for OCT4/NANOG/SOX2/SSEA-3/SSEA-4/TRA-1-60 and TRA-1-81 (Fig. 1E, scale bar: 88 μm) which was comparable to the parental iPSC line. Spontaneously differentiated cells were immunostained for endodermal marker α-1 fetoprotein (AFP), mesodermal marker α-smooth muscle actin (SMA) and ectodermal marker β-III tubulin (TUJ1) confirming their *in vitro* differentiation capacity of forming all three germ layers (Fig. 1F, scale bar: 88 μm). The

absence of mycoplasma contamination was verified by PCR (Supplementary Fig. S1). Furthermore, STR analysis of 16 loci showed 100% match between gene-corrected and parental iPSC lines (information available with the authors). In summary, an isogenic control (UAMi-006) from a PA iPSC line with *PCCB* defects (UAMi-004) has been successfully generated using CRISPR/Cas9 technology, meanwhile preserving its stem cell features (Fig. 1, Table 1).

4. Materials and methods

4.1. iPSC culture

iPSCs were cultured in mTESRTM1 medium (StemCellTM Technologies) on plates coated with Matrigel[®] (Corning) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were passaged with ReleSRTM or with AccutaseTM (both from StemCellTM Technologies) into a single cell suspension and resuspended in mTESRTM1 with 10 μM Rock inhibitor (StemCellTM Technologies) every 3–4 days at 1:4 or 1:5 split ratio.

4.2. CRISPR/Cas9 gene correction

The web resource <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/> was used to design three guides with high specificity to *PCCB* target sites with the least number of predicted off-targets which were located in functional genome regions (Table 2). One day prior to nucleofection, cells were pretreated with mTESRTM1 medium supplemented with CloneR 1X (StemCellTM Technologies). At day of nucleofection, 7 × 10⁵ cells were nucleofected by Amaxa NucleofectorTM II Device, according to providers instructions, with ribonucleoprotein complexes formed by the combination of 11.5 μg of Cas9 (*Streptococcus pyogenes*, Integrated DNA Technologies (IDT)) and 3 μg of RNA duplex constituted by tracrRNA and RNA guides 1, 2 or 3 (IDT); and with 75 pmol of ssDNA (IDT) donor template (Table 2). Cells were transferred into one well of Matrigel-coated 24-well plate and cultured in 500 μl mTeSRTM1 containing CloneR 1X. Medium was changed daily and CloneR was removed 24 h later. 3 days post-nucleofection, cells were dispersed at low density into Matrigel-coated 100 mm dishes in mTeSRTM1 medium. About 7–10 days later, large colonies were picked and expanded.

4.3. Correction analysis

Genomic DNA was extracted from the iPSCs using QIAamp DNA

Table 1
Characterization and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology	Photography (Phase contrast microscopy)	Normal	Fig. 1 panel E
Phenotype	Qualitative analysis (Immunocytochemistry)	Positive for: OCT4, NANOG, SOX2, SSEA-3, TRA-1-81, SSEA-4 and TRA-1-60	Fig. 1 panel E
	Quantitative analysis (Flow cytometry)	SSEA-3: 88.5% SSEA-4: 99.9% TRA-1-60: 96.2% TRA-1-81: 95.3%	Fig. 1 panel D
Genotype	Karyotype (G-banding) and resolution	46XX Resolution 450-500	Fig. 1 panel C
Identity	STR analysis	16 sites tested and all of them matched	Available with the authors
Mutation analysis (IF APPLICABLE)	Sequencing	Homozygous c.1218_1231del14ins12 (p.Gly407Argfs*14) mutation in <i>PCCB</i> gene was corrected	Fig. 1 panel B
Microbiology and virology	Southern Blot OR WGS	Not performed	
	Mycoplasma	Mycoplasma testing by PCR: negative	Supplementary Fig. S1
Differentiation potential	Embryoid body formation	Expression of α-1-fetoprotein (endoderm), α-smooth muscle actin (mesoderm) and β-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- α -Fetoprotein	1:400	Dako Cat# A0008, AB_2650473
	Mouse IgG anti- α -smooth muscle actin	1:400	Sigma-Aldrich Cat# A5228, AB_262054
	Mouse IgG anti- β -III-Tubulin Tuj1	1:500	Covance Cat# MMS-435P, AB_231377
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
Primers			
	Target	Forward/Reverse primer (5'-3')	
PCR and Sequencing Target sequences (gRNA)	<i>PCCB</i> intron 10- intron 12 (exons 11 and 12: 601 bp) <i>PCCB</i> exon 12 (c.1218_1231del GGGCATCATCCGGCins TAGAGCACAGGA)	GGATGGCTGCTGAGGACAAA/ TCCACCACGGCTATGCTGTAG	
		gRNA1: ACAGGAATACGGTAGAGCAC gRNA2: AATACGGTAGAGCACAGGAA gRNA3: ATACGGTAGAGCACAGTGAA	
		TCTTCTCATGTCTAGGCACAGCACAGGAATACGGGGGCATCATCCGGCATGGTGCCAAGCTTCTCTACGCATTTGCTGAGGCA	
		TTCTCTCATGTCTAGGCACAGCACAGGAATACGGGGGCATCATCCGGCATGGTGCCAAGCTTCTCTACGCATTTGCTGAGGCA	
Off-targets PCR and sequencing analysis	AC090809.1 (gRNA2)	CTTCTAGATGACCTTGGCTCC/ GCATCTGAGGCTGCTTCTCTGT TGCCACCGAATGCTGCACAC/ CGAGGACATTGTAAGAGGTTGCC	
	C16orf95 (gRNA3)	CAGACGATGCTGTTGCCGATG/ GGTTCCACCATGTTAGCCAG	
	GALNT17 (gRNA3)	GGTCTGGCCAGTGAATAGG/ ACGGCTCTGAAGTTCACCAC	
Mycoplasma detection (PCR)	LRP5 (gRNA3) Mycoplasma species (986 bp: internal control band; and 520 bp: mycoplasma specific band)	Forward primers: CGCCTGAGTACGTTCCG CGCCTGAGTACGTACGC TGCCTGGGTAGTACATTCCG TGCTGAGTAGTACATTCCG CGCCTGAGTAGTATGCTCCG CACCTGAGTAGTATGCTCCG CGCCTGGGTAGTACATTCCG	
		Reverse primers: GCGGTGTGTACAAGACCCGA GCGGTGTGTACAAAACCCGA GCGGTGTGTACAACCCCGA	

Mini Kit (Qiagen) followed by PCR amplification using Supreme NZY Taq II 2x Green Master Mix kit (NZY) and the specific oligonucleotides indicated in Table 2. PCR was performed on a Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems) using the following conditions: 95 °C, 5 min; 30 cycles of [95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 15 s]; 72 °C, 7 min. PCR products were digested by *Msp*I, and the fragments analyzed by agarose gels with ethidium bromide. Then, in positive clones, the *PCCB* gene fragment containing exons 11 and 12 was amplified and cloned in *pGEM*[®]-*T Easy Vector System I*. Clones (first round of editing) and PCR products (second round of editing) were sequenced by Sanger sequencing (Macrogen) to confirm the correction of the homozygous mutation in the *PCCB* gene.

4.4. Pluripotent markers and differentiation assays

iPSC were seeded onto matrigel-coated 15 μ -Slide 8 well culture plates (Ibidi), fixed with Formaline Solution 10% (Sigma-Aldrich), and stained with anti-OCT4/NANOG/SOX2/SSEA-3/SSEA-4/TRA-1-60 and TRA-1-81 as previously described (Alonso-Barroso et al., 2017). Images were obtained using a Zeiss confocal microscope. Pluripotency-associated markers SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81 were also analyzed by flow cytometry as described (Alonso-Barroso et al., 2017) in a BD FACSCanto™ A instrument (Becton Dickinson) using FACSDiva 8.0 software. Unstained iPSCs and the corresponding isotype antibodies were used as negative controls to exclude data from non-specific

fluorescence. Embryoid body (EB) formation was applied by plating the dissociated cells onto 96-well v-bottom, low attachment plates (Deltalab). Emerging EB were replated on matrigel-coated 15 μ -Slide 8 well culture plates for another 15 days, fixed with Formaline Solution 10%, and stained with endodermal (AFP), mesodermal (SMA) and ectodermal (TUJ1) differentiation markers (Table 2).

4.5. Karyotyping

Cells were treated with 10 μ g/ml Colcemid® Solution (Irvine Scientific) for 90 min at 37 °C, dissociated by accutase, treated with hypotonic solution, and fixed with Carnoy's fixative for karyotype analysis. At least 20 metaphases were karyotyped.

4.6. STR analysis

DNA fingerprinting analysis was performed as previously described (Alonso-Barroso et al., 2017) at Parque Científico de Madrid, Campus Moncloa, UCM, Madrid, Spain.

4.7. Mycoplasma detection

Mycoplasma test was performed using PCR method (Uphoff and Drexler, 2014). A positive sample with mycoplasma was used as a control. In Supplementary Fig. S1: positive control (C+).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Research reported in this work was funded by Grant PAF107 from

the Propionic Acidemia Foundation and by grants SAF2016-76004-R from Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness - Agencia Estatal de Investigación and European Regional Development Fund (Fondos Feder) and PID2019-105344RB-I00/AEI/10.13039/501100011033 from Spanish Ministry of Science and Innovation. The authors thank Federación Española de Enfermedades Metabólicas Hereditarias and the patients' families for their collaboration and for agreeing to participate in the study, the Cytogenetic unit from Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) and Elena Montalvo for their excellent technical assistance. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa receives an institutional grant from Fundación Ramón Areces. AFC is a PhD student funded by the FPI-UAM program.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102055>.

References

- López-Márquez, A., Alonso-Barroso, E., Cerro-Tello, G., Bravo-Alonso, I., Arribas-Carreira, L., Briso-Montiano, Á., Navarrete, R., Pérez-Cerdá, C., Ugarte, M., Pérez, B., Desviat, L.R., 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 Res.* 38, 101469.
- Bollen, Y., Post, J., Koo, B.K., Snippet, H.J.G., 2018. How to create state-of-the-art genetic model systems: strategies for optimal CRISPR-mediated genome editing. *Nucleic Acids Res.* 46 (13), 6435–6454.
- 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 Opinion on Orphan Drugs.* 3, 1427–1438.
- 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.