



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Tesis Doctoral

Estimulación de la síntesis de nucleótidos como tratamiento de los defectos en la replicación del ADN mitocondrial

Cora Blázquez Bermejo

Tesis adscrita al Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina de la
Universitat Autònoma de Barcelona

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de Patología Neuromuscular y Mitocondrial
del Vall d'Hebron Institut de Recerca

Directores

Yolanda Cámara Navarro

Ramon Martí Seves

Tutor

Miquel Vila Bover

Universitat Autònoma de Barcelona

2019

RESUMEN

El síndrome de depleción y deleciones múltiples del ADN mitocondrial (ADNmt) (SDDM) engloba un grupo de enfermedades minoritarias de herencia autosómica, recesiva o dominante, debidas a alteraciones en el mantenimiento del ADNmt. Estas alteraciones se manifiestan como una pérdida de moléculas de ADNmt (depleción), acumulación de deleciones múltiples o de mutaciones puntuales en el ADNmt.

El espectro clínico del SDDM es muy amplio y heterogéneo. Puede manifestarse en un rango de gravedad muy distinto, desde afectaciones simples y relativamente leves, hasta afectaciones de progresión rápida y/o multiorgánicas que conducen a la muerte del paciente durante sus primeros años de vida. Genéticamente el SDDM es también muy heterogéneo y se asocia a mutaciones en genes nucleares cuyos productos intervienen en procesos relacionados de algún modo con el mantenimiento del ADNmt.

Uno de estos procesos es la homeostasis de dNTPs que resulta imprescindible para garantizar una correcta replicación del ADNmt. El presente trabajo de tesis doctoral consta de estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* para la aplicación de la administración de desoxirribonucleósidos (dNs) como precursores de la síntesis de dNTPs en el tratamiento de dos formas de SDDM, la deficiencia en timidina quinasa 2 (TK2) y en la subunidad catalítica de la polimerasa mitocondrial (POLG).

La TK2 es la quinasa responsable de la primera y limitante fosforilación de desoxitimidina (dThd) y desoxicitidina (dCtd) en mitocondria, esencial en la obtención de dTTP y dCTP. La deficiencia en TK2 se presenta típicamente como una miopatía grave que está asociada a una marcada depleción del ADNmt en músculo. Hemos ensayado la administración de dThd y dCtd en un modelo murino *knock-out* para *Tk2* (*Tk2*^{KO}). Estos ratones desarrollan una encefalomiopatía fatal que progresa rápidamente y conduce a la muerte a los 16 días de edad. Con el tratamiento la supervivencia de los ratones *Tk2*^{KO} asciende a 34 días, y los niveles de ADNmt en músculo se normalizan. A pesar de ello, el tratamiento pierde efecto con la edad. Describimos cambios importantes en el metabolismo de dNTPs que tienen lugar durante el desarrollo normal del ratón y contribuyen a reducir la eficacia del tratamiento con la edad.

Por otro lado, hemos trabajado con fibroblastos derivados de pacientes con mutaciones en la subunidad catalítica de la polimerasa-gamma (POLG), proteína que se encarga de la síntesis del ADNmt. Mutaciones en esta enzima causan SDDM con un amplio espectro clínico asociado a depleción y deleciones múltiples del ADNmt. El tratamiento basado en dNs induce un aumento en el contenido de los cuatro dNTPs mitocondriales, y esto es suficiente para restituir la capacidad replicativa del ADNmt sin alterar su fidelidad, en células con mutaciones en diferentes dominios funcionales de POLG.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la estimulación de la síntesis de dNTPs a través de la suplementación con dNs podría ser una estrategia terapéutica válida para SDDM distintos a la deficiencia en TK2 o POLG, así como para otras enfermedades en las que un incremento en la síntesis del ADNmt pueda resultar beneficioso.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ÍNDICE	3
ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	13
1. Las mitocondrias	14
1.1. Estructura y función	14
1.2. El ADN mitocondrial	16
1.2.1. Replicación del ADN mitocondrial.....	17
1.2.2. Fusión y fisión mitocondrial	19
1.3. Metabolismo de dNTPs	20
1.3.1. Síntesis de dNTPs mediante la ruta <i>de novo</i>	21
1.3.2. Síntesis de dNTPs mediante la ruta de salvamento	22
1.3.3. Catabolismo para la regulación del <i>pool</i> de dNTPs.....	23
1.3.4. Comunicación entre el <i>pool</i> de dNTPs mitocondrial y citosólico.....	24
1.4. Enfermedades mitocondriales	25
1.4.1. Epidemiología.....	25
1.4.2. Mutaciones en el ADNmt	26
1.4.3. Mutaciones en el ADNn.....	26
2. Síndrome de depleción y deleciones múltiples del ADNmt (SDDM)	27
2.1. Características clínicas de los SDDM	28
2.1.1. Oftalmoplegia externa progresiva (PEO).....	28
2.1.2. Encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE).....	28
2.1.3. Síndromes de espectro neurológico recesivo	29
2.1.4. Síndromes de depleción del ADNmt órgano-específica.....	29
2.2. Genes asociados a SDDM	30
2.2.1. Defectos en genes que codifican enzimas de la maquinaria de replicación del ADNmt	31
2.2.2. Defectos en genes que codifican proteínas necesarias en el mantenimiento de la homeostasis del <i>pool</i> de dNTPs mitocondriales.....	33
2.2.3. Genes que codifican proteínas involucradas en la fusión mitocondrial	35
2.2.4. Genes que actúan sobre el mantenimiento del ADNmt mediante un mecanismo no identificado	36
2.3. Modelos experimentales in vitro e in vivo	38
2.4. Aproximaciones terapéuticas para los SDDM	40
3. Administración de dNs como estrategia para tratar los SDDM	41

3.1.	Tratamiento con dNs para el déficit en TK2.....	42
3.1.1.	Historia natural de las deficiencias en TK2.....	42
3.1.2.	Estudios preclínicos en el modelo de ratón	45
3.1.3.	Tratamientos experimentales en pacientes.....	45
3.2.	Tratamiento con dNs para el déficit en POLG	47
3.2.1.	Presentación clínica de las deficiencias en POLG.....	47
3.2.2.	Estudios preclínicos en un modelo de fibroblastos de paciente deficientes en POLG	50
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	52
	Hipótesis.....	53
	Objetivos	53
	MATERIAL Y MÉTODOS	54
1.	Cultivos celulares.....	55
1.1.	Técnicas generales de cultivo.....	55
1.1.1.	Placas de cultivo utilizadas.....	55
1.1.2.	Medios de cultivo utilizados.....	55
1.1.3.	Congelación de células de cultivos celulares	56
1.1.4.	Descongelación de células de cultivos celulares.....	56
1.1.5.	Dilución de densidad de células de cultivos celulares ó tripsinización	56
1.1.6.	Recuento de células de cultivos celulares.....	57
1.1.7.	Preparación de células de cultivo para extracción de ADN	57
1.2.	Obtención de fibroblastos a partir de una biopsia de piel.....	58
1.3.	Células derivadas de pacientes con mutaciones en POLG	58
1.4.	Diseño experimental para el análisis de la recuperación del número de copias de ADNmt en fibroblastos primarios	61
1.5.	Extracción del ADN de muestras de células de cultivo	62
1.6.	Detección de deleciones múltiples del ADNmt por PCR larga	63
1.7.	Sequenciación del ADNmt.....	64
2.	Experimentación Animal	64
2.1.	Condiciones de estabulación.....	64
2.2.	Farmacocinéticas.....	64
2.3.	Tratamientos administrados a los ratones.....	64
2.4.	Diseño experimental	65
2.5.	Sacrificio y extracción de muestras.....	66
2.5.1.	Plasma	66

2.5.2. Órganos	66
2.6. Extracción de ADN de muestras de ratón	66
2.6.1. Con fines de genotipado	66
2.6.2. Con fines de realizar estudios bioquímicos.....	67
2.7. Genotipado de ratones	67
3. PCR cuantitativa a tiempo real.....	69
3.1. Cuantificación del número de copias de mtDNA por RT-PCR	69
Real-Time PCR para el estudio de depleción.....	69
Condiciones para la determinación en muestras humanas.....	70
Condiciones para la determinación en muestras de ratón	71
3.2. Expresión de enzimas en muestras de ratón	73
Extracción de RNA de órganos de ratones.....	73
Reacción RT-PCR para obtención de cDNA	74
Reacción RT-PCR para expresión.....	74
4. Ensayos Bioquímicos	75
4.1. Determinación de dNTPs totales en cultivos celulares	75
Crecimiento y tratamiento de las células.....	75
Recogida de células y extracción de dNTPs.....	75
Determinación enzimática de dNTPs	76
4.2. Determinación de dNs en medios de cultivo	78
Deproteinización de las muestras de medio de cultivo por ultrafiltración	79
4.3. Determinación de dNs en muestras de ratón	79
Preparación de las muestras de tejido.....	79
Deproteinización de las muestras de tejido y plasma por ultrafiltración	81
Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)	81
4.4. Actividad TP y CDA en muestras de ratón.....	82
Preparación de las reacciones.....	82
Homogenado de las muestras.....	82
Ensayo de actividad.....	83
Cromatografía líquida (UPLC).....	84
4.5. Actividad TK1 y dCK en muestras de ratón	84
5. Análisis estadístico	85
RESULTADOS	86
1. Estudio preclínico sobre el tratamiento con dNs en un modelo murino de deficiencia en TK2.....	88

1.1. Estudio farmacocinético preliminar de la dThd y dCtd en ratones.....	88
Introducción	88
Material y Métodos.....	88
Resultados y Discusión	88
1.2 Artículo I: Los cambios metabólicos debidos a la edad limitan la eficacia de la terapia basada en desoxirribonucleósidos en ratones deficientes en TK2	94
1.3 Estudio sobre la competencia de los dNs por la entrada al torrente sanguíneo	96
Introducción	96
Material y Métodos.....	96
Resultados y Discusión	96
1.4 Estudio de supervivencia con interrupción del tratamiento.....	98
Introducción	98
Material y Métodos.....	98
Resultados y Discusión	98
1.5 Estudio de la estimulación de la ruta de síntesis <i>de novo</i> de los dNTPs	101
Introducción	101
Material y Métodos.....	101
Resultados y Discusión	101
2. Artículo II: El incremento del <i>pool</i> de dNTPs recupera la depleción del ADNmt en fibroblastos de humanos deficientes en POLG	104
DISCUSIÓN	106
CONCLUSIONES	118
BIBLIOGRAFÍA	120
ANEXO	139
Propiedad intelectual derivada de este trabajo.....	140

ABREVIATURAS

<i>ABAT</i>	Gen que codifica GABAT
ADA	Adenosina desaminasa
ADNmt	ADN mitocondrial
adPEO	PEO autosómico dominante
AFG3L2	Subunidad catalítica de la proteasa m-AAA
AGK	Acilglicerol quinasa mitocondrial
AHS	Síndrome de Alpers-Huttenlocher
ANS	Espectro de ataxia neuropática
ANT1	Transportador del nucleótido de adenina mitocondrial en músculo
arPEO	PEO autosómico recesivo
BrEt	Bromuro de etidio
CDA	Citidina desaminasa
CNT	Transportador de nucleósidos conentrativo
CTA	Cadena de transporte de electrones
dAdo	Desoxiadenosina
dAMP	Desoxiadenosina monofosfato
dCK	Desoxicitidina quinasa
dCMP	Desoxicitidina monofosfato
dCtd	Desoxicitidina
dGK	Desoxiguanosina quinasa
dGMP	Desoxiguanosina monofosfato
dGuo	Desoxiguanosina
<i>DGUOK</i>	Gen que codifica dGK
dN	Desoxirribonucleósido
DNA2	ADN helicasa/nucleasa 2
dNDK	Desoxirribonucleósido difosfato
dNDP	Desoxirribonucleósido difosfato

dNMP	Desoxirribonucleósido monofosfato
dNTP	Desoxirribonucleósido trifosfato
dThd	Desoxitimidina
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
dUrd	Desoxiuridina
ENT	Transportador de nucleósidos equilibrativo
FBXL4	Proteína F-box y rica en repeticiones de leucina 4
FEN1	Endonucleasa 1 de cambio entre ARN y ADN
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GABAT	Gamma-aminobutirato transaminasa
GFER	Factor de crecimiento estimulador de la regeneración hepática
IOSCA	Ataxia espinocerebelar de aparición infantil
<i>KI</i>	<i>Knock-in</i>
<i>KO</i>	<i>Knock-out</i>
LSP	Promotor de la cadena L
MCHS	Espectro infantil miocerebrohepático
mdN	Nucleotidasa mitocondrial
MELAS	Encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios tipo ictus
MEMSA	Ataxia sensorial con miopatía epiléptica mioclónica
MERF	Epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas
MFN1	Mitofusina 1
MGME1	Exonucleasa I para el mantenimiento del genoma mitocondrial
MIRAS	Síndrome mitocondrial recesivo de ataxia
MNF2	Mitofusina 2
MNGIE	Encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial
MPV17	Proteína de la membrana mitocondrial interna

MSTO1	Regulador de la morfología y distribución mitocondrial misato 1
mtSSB	Proteína de unión al ssDNA
NDP	Ribonucleosido difosfato
NDPK	Nucleósido difosfato quinasa
NDPK	Nucleósido difosfato quinasa
NMPK	Nucleósido monofosfato quinasa
NTP	Ribonucleosido trifosfato
O _H	Origen de replicación de la cadena H
O _L	Origen de replicación de la cadena L
OPA1	Atrofia óptica 1
OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidativa
P53R2	Subunidad pequeña de la RNR inducible por p53
PEO	Oftalmoplegia externa progresiva
PNP	Purina nucleósido fosforilasa
POLG	Subunidad catalítica de la poly
POLG2	Subunidad accesoria de la poly
POLRMT	Polimerasa mitocondrial de ARN
Poly	Polimerasa gamma mitocondrial
R1	Subunidad catalítica de la RNR
R2	Subunidad pequeña de la RNR
RNasaH1	Ribonucleasa H1
RNR	Ribonucleotido reductasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
<i>RRM2B</i>	Gen que codifica para P53R2
SAMHD1	Proteína 1 con dominio SAM y HD
SANDO	Neuropatía atáxica sensorial, disartria y oftalmoplegia
SCAE	Ataxia espinocerebelar con epilepsia

SDDM	Síndrome de depleción y delección del ADNmt
<i>SLC25A4</i>	Gen que codifica ANT1
SPG7	Proteína componente de la proteasa m-AAA
ssDNA	Cadena única de ADN
SUCL	Succinil-CoA ligasa
SUCLA2	Subunidad β de SUCL
SUCLG1	Subunidad α de SUCL
SUCLG1	Subunidad β de SUCL
TFAM	Factor A de transcripción mitocondrial
TK1	Timidina quinasa 1
TK2	Timidina quinasa 2
TOP1MT	Topoisomerasa I mitocondrial
TP	Timidilato sintasa
TP	Timidina fosforilasa
Twinkle	Helicasa mitocondrial
<i>TYMP</i>	Gen que codifica TP

INTRODUCCIÓN

1. Las mitocondrias

La teoría de la endosimbiosis se postula hoy en día como el origen a lo que hoy conocemos como las mitocondrias. Originariamente las mitocondrias serían bacterias (*α -proteobacterias*), que tras un periodo de simbiosis con arqueas (*Asgard archaea*), se incorporaron a estas células por endosimbiosis. De esta manera, células bacterianas libres pasaron a ser orgánulos de células eucariotas, perdiendo su autonomía. Esta transición se dio gracias a una integración progresiva de ambas células, donde se ha ido produciendo un intercambio en los genes y proteomas entre el hospedador y el simbiote. Para ello se ha producido una transferencia de genes de la *α -proteobacteria* a la *Asgard archaea* y la evolución de un sistema de señalización de proteínas codificadas por el núcleo hacia el recién generado orgánulo [1, 2].

La bióloga americana Lynn Margulis en el año 1967 formuló la hipótesis de la evolución de la vida *Eukarya* en el artículo titulado “On the origin of mitosing cells” donde proponía que las mitocondrias derivaban de células autónomas y que las células eucariotas eran el resultado de la evolución de una simbiosis ancestral [3]. Hoy en día la teoría de la endosimbiosis es la más ampliamente aceptada para explicar el origen de las mitocondrias [4].

1.1. Estructura y función

Las mitocondrias son orgánulos esenciales que se encuentran en casi todas las células eucariotas, siendo los eritrocitos las únicas células que no las contienen [5]. Su función principal es la producción de energía. Cada tipo celular humano, tiene cientos de mitocondrias en el citoplasma, dependiendo del requerimiento energético del tejido en el que se encuentren. El rol más importante que juega la mitocondria es la generación de ATP a través del complejo de cadena de transporte de electrones (CTE) acoplado a un sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). No obstante, las mitocondrias también forman parte importante de una serie de procesos bioquímicos que incluyen entre otros la producción de calor, la apoptosis, la generación y detoxificación de especies reactivas del oxígeno (ROS), la homeostasis del calcio intracelular, la biosíntesis de grupos hemo y hormonas esteroideas, el metabolismo lipídico y de aminoácidos o la regulación del ciclo celular [6-8].

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que pueden desplazarse dentro del citoplasma celular, fusionarse y dividirse, en función de las necesidades de la célula. Tienen una morfología variada y con una estructura característica de doble membrana. Podemos por tanto diferenciar una membrana externa y una membrana interna con diferente composición lipídica y proteica, que separan el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana externa es lisa y permeable, conteniendo una gran cantidad de canales acuosos conocidos como porinas, que

permiten el paso de las moléculas pequeñas. La membrana interna en cambio es impermeable para la mayoría de los solutos y está muy plegada en lo que se conocen como crestas mitocondriales. Estas crestas hacen que el área de superficie de la membrana interna sea muy grande para contener los complejos de CTE responsables de la generación de energía. La CTE está compuesta por cuatro complejos multiheteroméricos (conocidos como complejo I - complejo IV), que transfieren los electrones extraídos a partir del metabolismo de los nutrientes por reacciones de reducción y oxidación secuenciales, a una molécula de oxígeno para producir agua. Este proceso está acoplado a la translocación de protones a través de la membrana interna por los complejos I, III y IV, generando un gradiente electroquímico que es utilizado para convertir ADP en ATP en el complejo V (también conocido como ATP sintasa). El gradiente electroquímico también se utiliza para otros procesos bioquímicos que tienen lugar en la membrana [9] (Ilustración 1).

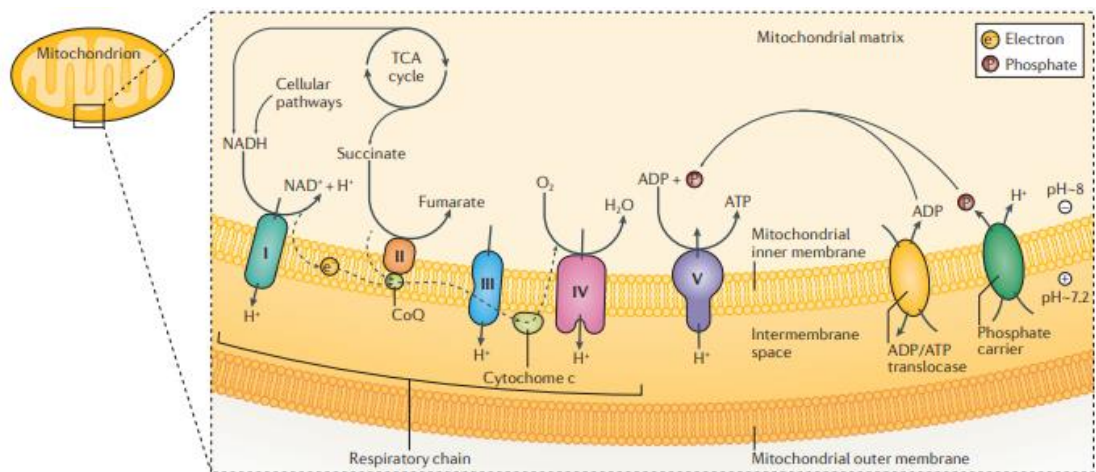


Ilustración 1. Representación esquemática de la fosforilación oxidativa. Las células utilizan este proceso metabólico para acumular energía en forma de ATP mediante la oxidación de nutrientes. La cadena respiratoria está formada por los complejos I-IV y el complejo V (imagen de *Gorman et al, Nat Rev Dis Primers, 2016* [10]).

Se ha estimado que son necesarias unas 1500 proteínas para mantener la estructura y función de una mitocondria [11]. Las mitocondrias están bajo un control de genoma dual. Por un lado, en su matriz contienen su propio ADN mitocondrial (ADNmt), que codifica para solamente 13 proteínas mitocondriales esenciales (que forman parte de las subunidades de los complejos I, III, IV y V de la CTE) [12]. Por otro lado, más del 99% de las proteínas mitocondriales están codificadas por genes nucleares (ADNn), sintetizadas en el citoplasma e importadas a la mitocondria (incluyendo el resto de subunidades de la CTE, factores de regulación de la expresión del ADNmt, enzimas, transportadores, factores de ensamblaje de la CTE...). Por lo tanto, la función mitocondrial y su correcta homeostasis están bajo el control tanto del ADNmt como del ADNn. De todas estas proteínas, solamente un centenar están directamente

involucradas en la fosforilación oxidativa y la producción de ATP. La genética dual del metabolismo mitocondrial hace que las mutaciones en ambos genomas puedan dar lugar a disfunciones y enfermedades mitocondriales. Estas características genéticas explican por qué las enfermedades mitocondriales pueden tener cualquier patrón de herencia. Podremos encontrar mutaciones en el ADNn que den lugar a enfermedades de transmisión autosómica (tanto dominantes como recesivas) o unidas al cromosoma X, así como mutaciones en el ADNmt transmitidas por herencia materna [13].

1.2. El ADN mitocondrial

Una célula humana puede contener miles de copias de ADNmt distribuidas dentro de cientos de mitocondrias individuales o formando una red intracelular [14]. El ADNmt está compuesto por una doble cadena circular de 16.569 pares de bases que contienen 37 genes requeridos para la producción energética. Estos genes codifican 13 proteínas de las subunidades del complejo de CTE, 22 ARNs de transferencia (ARNt) y 2 ARNs ribosomales (ARNr) (Ilustración 2).

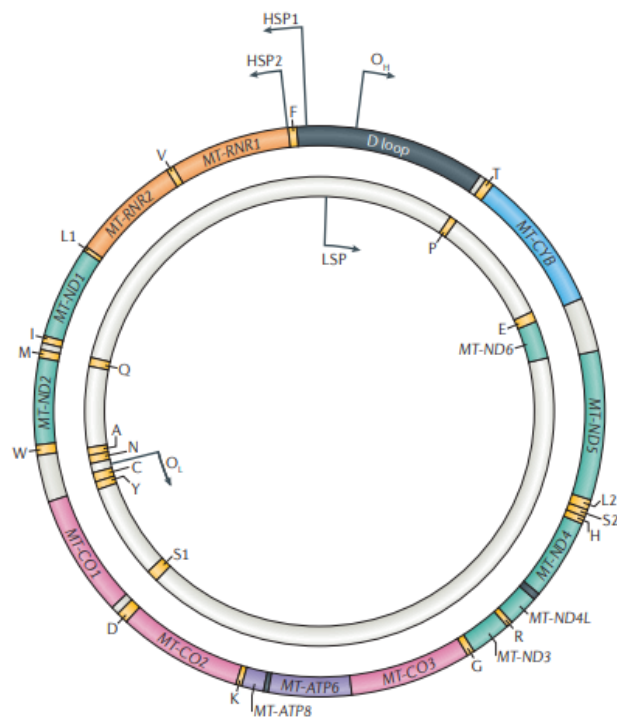


Ilustración 2. Genoma mitocondrial humano. El ADNmt humano es una molécula circular de 16,6 kb que codifica 13 subunidades de la cadena de transporte de electrones, 2 ARNr (en naranja) y 22 ARNt (en amarillo). Además, incluye una región no codificante de 1,1 kb llamada D-loop con función reguladora (en negro). OH y OL son los orígenes de replicación de la cadena pesada (*heavy-strand*) y ligera (*light-strand*) respectivamente. HSP, *heavy-strand promoter*; LSP, *light strand promoter* (imagen de Gorman et al, Nat Rev Dis Primers, 2016 [10]).

En función de su densidad por su distinto contenido en nucleótidos de guanina y citosina, se distinguen dos hebras conocidas como hebra pesada (H, *heavy*) y ligera (L, *light*). El ADNmt contiene escasas regiones de control donde se encuentran los promotores y orígenes de

replicación de ambas hebras. Cada hebra tiene su propio origen de replicación, O_H es el de la hebra H y O_L el de la hebra L [15]. El ADNmt está organizado en complejos de proteína-ADN llamados nucleoides, que proporcionan unidades eficientes de segregación del ADNmt, conteniendo de una a varias copias de ADNmt [16, 17]. Algunas de las proteínas que componen los nucleoides son multifuncionales, con roles tanto en el mantenimiento del ADNmt como en el metabolismo intermediario. Los nucleoides están anclados a la membrana interna mitocondrial por la parte de la matriz y se encargan de que el material genético de la mitocondria se distribuya a lo largo de las mitocondrias. Forman unidades de replicación autónoma que se pueden segregar independientemente y están distribuidas uniformemente dentro de la red mitocondrial [18, 19].

El replisoma mitocondrial está formado por una serie de enzimas que son necesarias para sintetizar el ADNmt durante su replicación. Estas enzimas necesitan estar en cantidades equilibradas para funcionar correctamente. El intercambio intramitocondrial de contenidos a través de la fusión mitocondrial permite el mantenimiento de un proteoma en correcta homeostasis. Además, una suplementación equilibrada de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) es necesaria para su correcto funcionamiento.

1.2.1. Replicación del ADN mitocondrial

El ADNmt humano se replica y repara gracias a la polimerasa γ (pol γ), una enzima heterotrimérica compuesta por una subunidad catalítica de 140 kDa (p140) codificada por *POLG* y dos subunidades accesorias homodiméricas de 55 kDa (p55) codificadas por *POLG2* [20] (Ilustración 3). El gen *POLG* contiene 23 exones y su proteína madura (POLG, también denominada POLG1 ó POLG α) está dividida en tres dominios funcionales. Contiene un dominio 3'-5' exonucleasa, un dominio *linker* y un dominio con actividad polimerasa 5'-3' muy conservado. El dominio exonucleasa incrementa la fidelidad de la replicación del ADNmt proporcionando actividad correctora a la enzima y actividad 5' desoxirribosa fosfato (dRP) liasa [21]. Las subunidades accesorias se unen asimétricamente a la subunidad catalítica, donde cada monómero juega un rol distinto, otorgando alta procesividad y aumentando la afinidad por el ADN [22]. El p55 proximal aumenta la afinidad de unión al ADN, mientras que el p55 distal es importante para la aceleración en la incorporación de dNTPs [23, 24]. La pol γ es una enzima de la maquinaria de replicación del ADNmt, pero para realizar su función necesita de un conjunto de proteínas con las que forma el replisoma completo del ADNmt [25].

Twinkle (codificada por el gen *TWINK*) funciona como una ADN helicasa 5'-3' y es necesaria para la rotura de los puentes de hidrógeno que mantienen las dos hebras de ADN unidas, causando

una desnaturalización del ADNmt, desenrollando la hebra y separándola permitiendo el avance de la polimerización [26]. La topoisomerasa I mitocondrial (TOP1MT) es otro de los componentes del replisoma del ADNmt que actúa sobre la topología del ADNmt desenrollándolo al frente de la horquilla de replicación. Se encarga de liberar tensión en la doble hélice del ADNmt catalizando la escisión transitoria de la doble hélice de ADNmt y su posterior ligación [27, 28]. La ARN polimerasa mitocondrial (POLRMT), además de su función en la transcripción, actúa como primasa para la replicación del ADNmt. Junto con el factor A de transcripción mitocondrial (TFAM), juegan un papel importante en la producción del ARN *primer* para iniciar la replicación del ADNmt por la pol γ [29, 30]. TFAM además de ser necesario en la replicación y unirse de forma específica a las secuencias promotor, también se une de forma inespecífica a lo largo de toda la molécula jugando un papel muy importante en el empaquetamiento del ADNmt [31]. Otro de los componentes esenciales en la síntesis del ADNmt es la proteína de unión al ADNmt de cadena simple (ssDNA) (mtSSB). El mtSSB se une a las cadenas de ssDNA estabilizándolas y evitando que renaturalicen durante el proceso de replicación. La exonucleasa I para el mantenimiento del genoma mitocondrial (MGME1), la ADN ligasa III mitocondrial, la ribonucleasa H1 (RNasa H1) y la endonucleasa 1 de cambio entre ARN y ADN (FEN1), son otras de las enzimas necesarias para la correcta replicación, mantenimiento y reparación del ADNmt [32]. La ADN helicasa/nucleasa 2 (DNA2) también es necesaria para el mantenimiento del ADNmt y ADNn por su función en la reparación y replicación del ADN [33]. Además, DNA2 ha demostrado estimular la actividad de pol γ y colocaliza con Twinkle en el nucleóide mitocondrial, sugiriendo un rol importante en el replisoma [34].

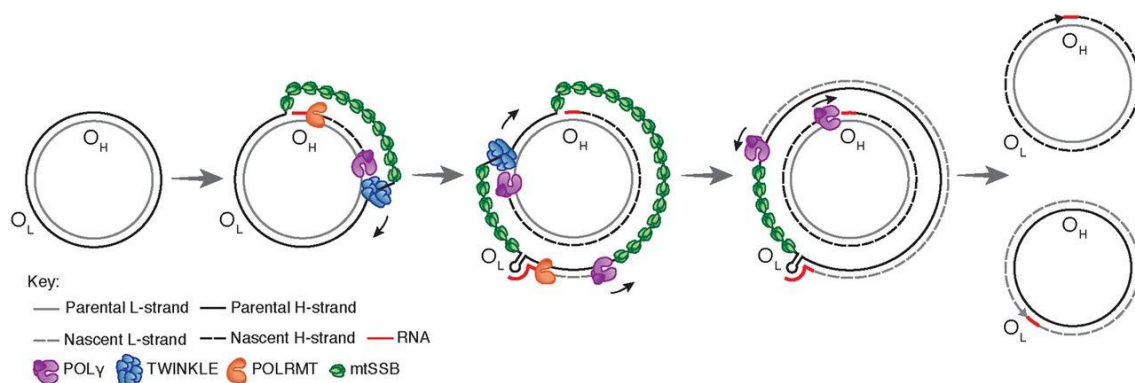


Ilustración 3: Modelo asimétrico de replicación del genoma mitocondrial humano. La replicación del ADNmt se inicia en el O_H y se desplaza unidireccionalmente produciendo la cadena H. El mtSSB se une y protegé la otra cadena H expuesta. Cuando el replisoma pasa por el O_L , una estructura de loop se forma y bloquea la unión de mtSSB, formando una región de loop de hebra simple desde donde POLRMT puede iniciar la síntesis de *primers*. La transición a la síntesis de ADN de la hebra L tiene lugar cuando la POLG reemplaza la POLRMT al final 3' del *primer*. La síntesis de las dos hebras tiene lugar de forma continua hasta que dos moléculas de cadena doble de ADN se han formado (imagen de Maria Falkenberg, *Essays in Biochemistry*, 2018 [35]).

La replicación del ADNmt de una célula animal es lenta y compleja, tardando una hora aproximadamente en sintetizar ambas hebras hijas. Se trata además de un proceso continuo, independiente de la división celular. Se han propuesto diferentes mecanismos para la replicación del ADNmt, siendo la replicación asincrónica el modelo más aceptado. En este modelo de replicación, también conocido como modelo asimétrico de desplazamiento de hebra, hay dos orígenes de replicación independientes y unidireccionales que promueven al replisoma a iniciar una síntesis continua de ADN, pero el inicio de los dos orígenes de replicación no ocurre al mismo tiempo. La replicación del ADNmt se inicia en el O_H con la síntesis de la cadena H. El O_H está localizado en el D-loop, una región no codificante que contiene las principales secuencias de regulación para la transcripción y el inicio de la replicación [36]. A partir del promotor de la cadena L (LSP) se genera un fragmento de RNA por la acción de la POLRMT que sirve de *primer*. Pocos nucleótidos después se produce una transición a DNA que coincide con el inicio de replicación O_H . La hebra H que se va desplazando, se va cubriendo con mtSSB lo que previene su renaturalización. De acuerdo con este modelo de replicación, la síntesis de la cadena H progresa y cuando está a dos tercios del camino, llega al O_L donde se inicia la síntesis de la cadena L. Una vez la horquilla de replicación de la cadena molde H pasa el O_L , ésta adopta una estructura de *loop* que es reconocida por la POLRMT. La POLRMT inicia la síntesis del *primer* para la cadena L. POLRMT no puede avanzar en fragmentos de ssDNA por lo que pronto se substituye por la pol y para que pueda avanzar la síntesis de la cadena L en la dirección contraria a la que se estaba sintetizando la cadena H. La mtSSB o el ARN cubren y estabilizan la cadena H que se va desplazando durante la replicación del ADNmt (intervalo entre el inicio de la cadena H y la síntesis de la cadena L) [37]. La RNasa H1 es esencial en la terminación de la replicación por su función en la eliminación del *primer* [38]. En este proceso de terminación de la replicación también actúan la MGME1, DNA2, FEN1 y ADN ligasa III mitocondrial [39].

El otro modelo de replicación del ADNmt conocido como *bootlace*, defiende que la replicación del ADNmt tiene lugar de forma simétrica y simultánea en ambas cadenas. Este modelo implica que transcritos de ARN procesados se unen a lo largo de la hebra H desplazada en la dirección 3'-5' y se mantienen hibridados sirviendo de *primers* para la síntesis de ADN hasta que son desplazados, degradados o procesados [40].

1.2.2. Fusión y fisión mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que están constantemente dividiéndose (fisión) o uniéndose con otras mitocondrias (fusión). Estos procesos se dan con el objetivo de mantener un proteoma balanceado para un correcto funcionamiento de la mitocondria [41]. La fisión mitocondrial requiere una correcta coordinación entre la membrana externa e interna por la

acción de diversas GTPasas. Para la fusión mitocondrial en cambio, son necesarias las proteínas mitofusina 1 (MFN1) y mitofusina 2 (MFN2) que modulan la fusión de la membrana externa, y la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1) que está asociada a la membrana interna mitocondrial [42]. OPA1 es una GTPasa localizada en la membrana interna mitocondrial involucrada en la fusión mitocondrial, organización de las crestas y el control de apoptosis. Además, OPA1 ancla los nucleoides en la membrana interna de las mitocondrias, permitiendo su futura distribución y promoviendo la replicación del ADNmt. Existen otras proteínas mitocondriales como la proteína F-box y rica en repeticiones de leucina 4 (FBXL4) que juegan papeles importantes en el proceso de fusión mitocondrial mediante la regulación e interacción con otras proteínas de fusión [43]. Recientemente, se identificó una proteína citosólica, Regulador de la morfología y distribución mitocondrial misato 1 (MSTO1) que se localiza como factor soluble en la interfaz citosol-membrana mitocondrial externa e interactúa con la maquinaria de fusión mitocondrial participando de forma esencial en el proceso de fusión [44].

1.3. Metabolismo de dNTPs

Los dNTPs son las moléculas necesarias para la síntesis del ADN y por tanto son esenciales para cualquier célula. Para la replicación tanto del ADNmt como del ADNn, es necesario un buen equilibrio del *pool* de dNTPs. La tasa de síntesis de dNTPs depende de las necesidades nucleares de replicación del ADN que, a diferencia de la síntesis del ADNmt, está limitada a la fase S del ciclo celular. Cuando nos encontramos fuera de la fase S el *pool* de dNTPs se reduce y es 10 veces menor que el de las células en división [45].

Las células utilizan dos rutas para la síntesis de dNTPs: la ruta de síntesis *de novo* y la ruta de salvamento (Ilustración 4). La ruta de síntesis *de novo* tiene lugar en el citosol y está regulada por el ciclo celular, operando principalmente durante la fase S del ciclo y disminuyendo drásticamente su actividad en las fases post-mitóticas donde la célula no se divide. La ruta de salvamento en cambio tiene lugar tanto en el citosol como en la mitocondria y sigue activa en células post-mitóticas o quiescentes.

A diferencia del ADNn, que únicamente se replica durante la división celular, el ADNmt se sintetiza continuamente e independientemente del ciclo celular. Dentro de la mitocondria no existe una síntesis *de novo* de dNTPs y la membrana interna de la mitocondria es impermeable a estas moléculas cargadas. Es por eso por lo que, para mantener la replicación del ADNmt, se necesita un *pool* de dNTPs mitocondriales equilibrado que provenga de las rutas de salvamento mitocondrial o por importe de dNTPs citosólicos a la matriz mitocondrial, vía transportadores específicos [46, 47].

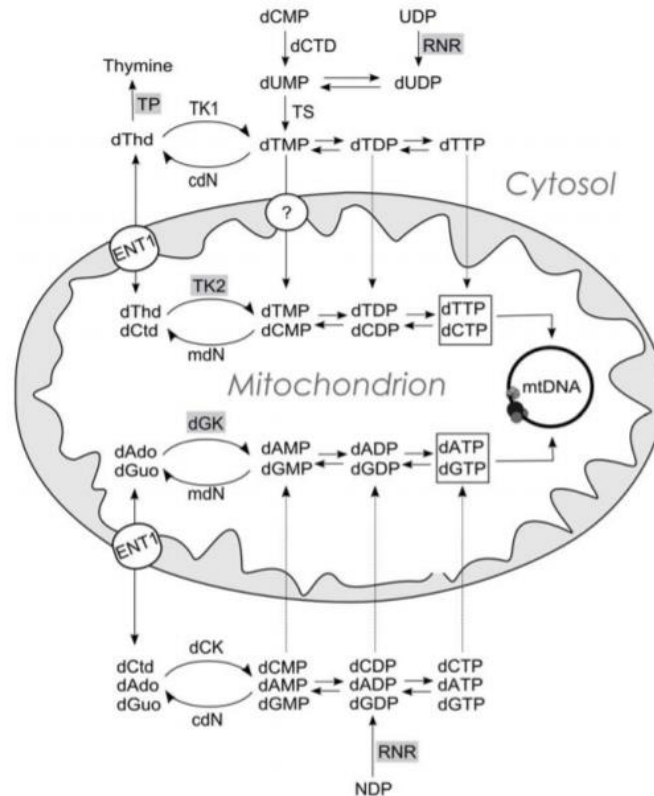


Ilustración 4: Representación esquemática de las rutas metabólicas que suplementan dNTPs para la replicación del ADNmt. dThd: desoxitimidina; dCtd: desoxicitidina; dAdo: desoxiadenosina; dGuo: desoxiguanosina; TP: timidina fosforilasa; TK1: timidina quinasa 1; TK2: timidina quinasa 2; dGK: desoxiguanosina quinasa; dCK: desoxicitidina quinasa; cdN y mdN: desoxinucleotidilasa citosólica y mitocondrial; dCTD: dCMP desaminasa; TS: timidilato sintasa; RNR: ribonucleotido reductasa. ENT1: transportador equilibrativo de nucleósidos 1. Los círculos con interrogación indican evidencias de transporte concentrativo de dTMP. Las enzimas en gris están involucradas en el síndrome de depleción del ADNmt (imagen de *Gonzalez-Vioque et al, PLoS Genet, 2011 [48]*).

1.3.1. Síntesis de dNTPs mediante la ruta *de novo*

La biosíntesis de dNTPs mediante la ruta *de novo*, empieza con moléculas pequeñas como los aminoácidos o el CO₂. Existen varias enzimas citosólicas involucradas en el metabolismo de nucleótidos dentro de esta ruta, que son importantes para el mantenimiento de un *pool* de dNTPs equilibrado tanto en el citosol como en la mitocondria, indispensable para la replicación y reparación del ADN tanto mitocondrial como nuclear.

Los productos de esta ruta son los ribonucleósidos difosfato (NDP), para posteriormente reducirse a desoxirribonucleósidos (dNs) difosfato (dNDPs) por la acción de la enzima citosólica ribonucleótido reductasa (RNR). Estos dNDPs son fosforilados una vez más por las nucleósido difosfato quinasa (NDPKs) a su dNTP correspondiente. La RNR es una de las enzimas claves en la ruta *de novo*, y consiste en un heterotetrámero compuesto por dos subunidades catalíticas grandes (R1) y dos subunidades pequeñas que presenta dos isoformas (R2 o p53R2, subunidad

inducible por p53). La actividad RNR, además de estar regulada alostéricamente, está controlada tanto a nivel transcripcional como traduccional, siendo durante la fase S del ciclo celular cuando más actividad presenta [49]. Durante la división celular, el complejo R1/R2 es el principal proveedor de dNTPs. En las células quiescentes, la expresión de la subunidad R2 está reprimida y degradada por proteólisis, pero en su lugar la subunidad p53R2 forma un complejo estable junto con la subunidad R1. El complejo R1/p53R2 puede sintetizar dNTPs en células post-mitóticas para mantener el *pool* de dNTPs suficiente para la reparación de ADN [50, 51] y el mantenimiento del ADNmt [52].

La actividad de la timidilato sintasa (TS) también es indispensable en esta ruta para la síntesis de dTTP. Esta enzima se encarga de catalizar la metilación de dUMP a dTMP y también está regulada por el ciclo celular, expresándose principalmente durante la fase S [53, 54].

1.3.2. Síntesis de dNTPs mediante la ruta de salvamento

La ruta de salvamento recicla dNs, nucleósidos y nucleobases preexistentes, para sintetizar los dNTPs correspondientes. En esta ruta hay cuatro enzimas con actividad quinasa que son muy importantes y se encargan de la producción de desoxirribonucleósidos monofosfatos (dNMP) a partir de dNs. Estas desoxirribonucleósido quinasas, catalizan la transferencia de un grupo fosfato proveniente del ATP u otro ribonucleósido trifosfato, formando los dNTPs. Se trata de las enzimas más limitantes en la ruta de salvamento de síntesis de dNTPs [55].

Dentro de la ruta de salvamento mitocondrial, y localizadas en la matriz mitocondrial, encontramos a la timidina quinasa 2 (TK2), un monómero de 29 kDa que juega un papel importante en la síntesis de dNTPs de pirimidina. Concretamente la TK2 se encarga de catalizar el primer paso y más limitante en la fosforilación de dNs de pirimidina, convirtiendo la desoxicitidina (dCtd) y desoxitimidina (o timidina, dThd) en desoxicitidina monofosfato (dCMP) y timidina monofosfato (dTMP), respectivamente [56]. Por otro lado, el primer paso en la ruta de salvamento de las purinas dentro de la mitocondria, está mediado por la desoxiguanosina quinasa (dGK) la cual fosforila la desoxiguanosina (dGuo) y la desoxiadenosina (dAdo) a desoxiguanosina monofosfato (dGMP) y desoxiadenosina monofosfato (dAMP) respectivamente [57]. Se trata de un dímero de dos subunidades idénticas de 30 kDa.

En la ruta de salvamento citosólica, encontramos otras dos enzimas que realizan la misma función que la TK2 y la dGK. Por un lado, tenemos la timidina quinasa 1 (TK1) y por otro la desoxicitidina quinasa (dCK). La TK1 fosforila únicamente dThd a dTMP, y dUrd a dUMP, siendo la desoxirribonucleósido quinasa con mayor especificidad de sustrato [58]. Basándonos en la secuencia de amino ácidos, esta proteína es la que menos se parece el resto y se clasifica en una

familia de proteínas diferente con similitud a la kinasa de herpesvirus que también incluye las timidilato kinasas. Actúa como homodímero u homotetrámero con un tamaño de subunidad de 24 kDa. Está fuertemente regulada por ciclo celular tanto a nivel transcripcional como postraduccional, y su actividad aumenta en fase S. La dCK fosforila dNs de purina y pirimidina, preferentemente la dCtd a dCMP, pero también la dAdo y la dGuo a dAMP y dGMP respectivamente. Está compuesta por dos polipéptidos idénticos de 261 amino ácidos [59].

Todos estos dNMP generados, experimentan dos fosforilaciones adicionales y sucesivas antes de convertirse en dNTPs. Las nucleósido monofosfato quinazas (NMPKs) catalizarán la primera fosforilación convirtiendo los dNMPs en desoxirribonucleósidos difosfato (dNDP), mientras que las nucleósido difosfato quinazas (NDPKs) catalizarán la segunda fosforilación convirtiendo los dNDP en dNTPs [60]. Las NDPK mitocondriales, forman un complejo con la succinil-CoA ligasa (SUCL) y la gamma-aminobutirato transaminasa (GABAT). La interacción física entre los tres enzimas y la formación de este complejo se cree esencial para la función de la NDPK mitocondrial y la consecuente generación de dNTPs. Tanto SUCL (compuesta por una subunidad alfa y una subunidad beta) como GABAT, están consideradas como enzimas de función dual [61, 62]. Además de ayudar a NDPK en la síntesis de dNTPs, SUCL es una enzima del ciclo de Krebs que cataliza la conversión reversible de succinil-CoA y ADP o GDP a succinato y ATP o GTP. GABAT por otro lado, cataboliza el principal neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido gamma-aminobutírico) en la matriz mitocondrial [61, 62].

1.3.3. Catabolismo para la regulación del *pool* de dNTPs

El *pool* de dNTPs depende tanto de las dos rutas anabólicas que hemos descrito, como de otro tipo de enzimas catabólicas que se encargan de degradar los dNTPs sintetizados creando ciclos de regulación en función de las necesidades celulares.

Por un lado, los dNMPs producto de las quinazas, son reconvertidos en dNs por mediación de las 5'-desoxirribonucleotidasas mediante desfosforilación [63]. Se conocen muchas nucleotidasas en el citosol, pero solamente se ha encontrado una en la mitocondria (mdN) [64].

Por otro lado, existen otras enzimas que se encargan de degradar estos dNs. Las nucleósido fosforilasas (nucleosidasas), son un grupo de enzimas catabólicas que compiten con las desoxirribonucleósido quinazas por la degradación o activación de los dNs. Las nucleosidasas limitan la expansión del *pool* de dNTPs por degradación fosforolítica. Dentro de este grupo encontramos la timidina fosforilasa (TP), una de las enzimas importantes en esta ruta que cataliza la fosforólisis de dThd y dUrd. Por otro lado, encontramos a la purina nucleósido fosforilasa (PNP) que degrada la dGuo y la desoxiinosina. Las desaminasas catalizan la

eliminación de un grupo amino de dNs. En este grupo encontramos la citidina desaminasa (CDA) que degrada la dCtd a dUrd y por otro lado la adenosina desaminasa (ADA) que cataliza la conversión de dAdo a dIno [65].

Tal y como hemos visto los competidores más eficientes para las desoxirribonucleósido quinazas de purina son la PNP y la ADA. Ambas enzimas son citosólicas y muy activas y efectivas previniendo la acumulación de dGTP y dATP en células de mamífero y por tanto, degradando los sustratos de la dCK y la dGK. La acción de estas enzimas es muy importante para evitar la expansión del *pool* de dNTPs de purina dado que su acumulación es muy peligrosa, siendo dGTP y dATP efectores alostéricos negativos de la RNR [66]. Esto conduciría a una inhibición de la síntesis *de novo* de los dNTPs mediada por la RNR y a un desbalance en el *pool* de dNTPs. Deficiencias en PNP y ADA son causa de enfermedades graves en las que la inmunidad de los pacientes está comprometida [67, 68].

Por último, tenemos la proteína 1 con dominio SAM y HD (SAMHD1), una trifosfohidrolasa que defosforila los dNTPs directamente a dNs. La reacción necesita la estimulación de dGTP. Esta enzima juega un papel muy importante en el manteniendo de la homeostasis de los dNTPs celulares y su deficiencia también da lugar a inmunodeficiencias [69, 70].

1.3.4. Comunicación entre el *pool* de dNTPs mitocondrial y citosólico

Aunque el *pool* de dNTPs citosólicos y mitocondriales se encuentran separados por la doble membrana mitocondrial, ambos compartimentos están interconectados e intercambian componentes a través de transportadores especializados. En células post-mitóticas, donde el *pool* de dNTPs citosólico se ha reducido de forma muy importante, la célula utiliza esencialmente de la ruta de salvamento, y la mitocondria se vuelve más dependiente de su propia capacidad para generar dNTPs, donde las enzimas TK2 y dGK son indispensables. En células en división en cambio, el *pool* de dNTPs citosólico, y también mitocondrial, se mantiene sobre todo gracias al importe de dNTPs citosólicos derivados de las rutas *de novo*. Para permitir este importe del citosol a la matriz mitocondrial, son necesarios transportadores de membrana especializados.

El transporte de nucleósidos en humanos está mediado por dos familias de proteínas, la familia SLC28 compuesta por los transportadores concentrativos (CNT) y la familia SLC29 compuesta por los transportadores equilibrativos (ENT) [71, 72], presentando diferente distribución tanto en órganos como en tejidos celulares [73]. Por ahora no se han caracterizado transportadores de dNMPs, dNDPs o dNTPs.

Los CNT tienen 3 miembros (CNT1, CNT2 y CNT3) y presentan mayor afinidad por el sustrato pero una selectividad más restringida. Estos transportadores median el flujo unidireccional de nucleósidos haciendo un gasto energético a través de gradientes transmembrana de sodio. La estequiometría sodio:nucleósido de cada uno de los CNT también es diferente [74] y aunque normalmente se acoplan a Na^+ , el CNT3 ha demostrado poder acoplarse también a H^+ para el transporte de nucleósidos [75]. El CNT3 es el que presenta mayor espectro de selectividad y una capacidad concentrativa más alta [76].

Los ENT están compuestos por 4 miembros (ENT1, ENT2, ENT3 y ENT4) y se caracterizan por baja afinidad pero amplia selectividad de sustrato. Los ENT median la entrada de los nucleósidos de forma bidireccional a través de la membrana plasmática y a favor de gradiente de concentración [77]. ENT1 y ENT2 son los principales transportadores equilibrativos transportando nucleósidos a través de la membrana plasmática y funcionan tanto con nucleósidos de purinas como de pirimidina. En la membrana mitocondrial únicamente se han encontrado localizados los transportadores ENT1 [78] y en ENT3 que funciona predominantemente dentro de la célula [79].

1.4. Enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de patologías clínicamente y genéticamente muy heterogéneas, debidas a variantes patogénicas en el ADNmt y en los genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales [80]. Estas mutaciones dan lugar a disfunción de la CTE y daños en el complejo OXPHOS con la consiguiente incapacidad de generar la energía suficiente para las necesidades de los diferentes tejidos. Los órganos con mayores requerimientos energéticos suelen ser los más afectados. El sistema nervioso central, músculos cardíaco y esquelético, sistema endocrino, el hígado y el sistema renal, suelen ser claros ejemplos de órganos afectados por patologías mitocondriales [81].

1.4.1. Epidemiología

Las enfermedades mitocondriales se encuentran dentro de las enfermedades raras, siendo su prevalencia desde 5 a 15 casos por cada 100.000 individuos (con aparición en la infancia a una edad <16 años). Las variaciones en la prevalencia están afectadas por los criterios de inclusión que se utilizan en cada caso. Además, estas variaciones son debidas a la presencia de mutaciones genéticas fundadoras y a la consanguinidad. Las mutaciones genéticas fundadoras, aumentan la prevalencia de enfermedades mitocondriales específicas en ciertas poblaciones [82, 83]. Las poblaciones con alta consanguinidad muchas veces muestran un incremento en la prevalencia de enfermedades hereditarias, sobre todo cuando hablamos de aquellas que tienen herencia autosómica recesiva [84, 85].

En adultos, la prevalencia de las enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en el ADNmt está estimada en 9,6 casos por cada 100.000 individuos, mientras que la prevalencia de las debidas a mutaciones en el ADNn está estimada en 2,9 casos por cada 100.000 individuos [86].

1.4.2. Mutaciones en el ADNmt

El ADNmt se hereda por vía materna y durante el desarrollo embrionario temprano las únicas mitocondrias que tienen las células son las adquiridas mediante el ovocito, ya que las mitocondrias provenientes del espermatozoide se eliminan. No obstante, existen trabajos recientes que sugieren que, de forma muy poco frecuente y asociado a defectos en los procesos de autofagia, es posible la transmisión del ADNmt proveniente del espermatozoide [87]. El ADNmt está continuamente sintetizándose independientemente del ciclo celular, a diferencia del ADNn que sólo replica en la fase S del ciclo. Las células requieren un número adecuado de moléculas de ADNmt para la producción de las subunidades del complejo de la CTE codificada por el ADNmt y por tanto para la producción de energía [88]. Mutaciones en el ADNmt pueden afectar de forma directa a subunidades de la CTE, o a alguno de los ARN de transferencia o ribosómicos necesarios para su expresión y también sintetizados a partir del ADNmt. En el primer caso, la alteración suele afectar de forma específica a uno de los complejos mientras que en el segundo, se ve afectado el proceso de traducción mitocondrial y por tanto los efectos se dan de forma generalizada en todos los complejos OXPHOS.

Dentro de una misma célula existen múltiples copias de ADNmt que variarán en función del tipo celular. Muchos pacientes con enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en el ADNmt, tienen una mezcla de ADNmt mutado y ADNmt sano. Esta característica es conocida como heteroplasmia y la proporción de copias de ADNmt con mutaciones patogénicas frente al sano, será un factor clave para determinar si la célula expresa algún defecto bioquímico. Cuando el grado de heteroplasmia es alto, tendremos células con altos niveles de ADNmt mutado y bajos niveles de ADNmt sano. El límite al que la deficiencia se manifiesta clínicamente varía en función de la mutación específica y del tipo celular en el que se encuentra, pero normalmente se requieren niveles mayores del 50% de ADNmt mutado para dar lugar a disfunción celular.

El diagnóstico clínico de estas enfermedades es complicado porque engloba una diversidad de fenotipos que pueden comprometer muchos órganos diferentes [12].

1.4.3. Mutaciones en el ADNn

De las 1500 proteínas que conforman el proteoma mitocondrial, tan solo 13 están codificadas por el genoma mitocondrial. El resto de proteínas que constituyen las subunidades de la CTE,

proteínas de ensamblaje, transportadores, enzimas... están codificadas por el genoma nuclear [89]. Las consecuencias patogénicas de las mutaciones en el ADNn que afectan a la mitocondria incluyen defectos en: las subunidades de la CTE, factores de ensamblaje e importe de proteínas a la mitocondria, traducción del ADNmt, metabolismo de lípidos o deficiencia en CoQ₁₀ además de la replicación del ADNmt en los cuales nos centraremos más profundamente [90]

2. Síndrome de depleción y deleciones múltiples del ADNmt (SDDM)

El mantenimiento del ADNmt depende de un número de genes nucleares que codifican las proteínas necesarias para la correcta síntesis del ADNmt y el mantenimiento de un *pool* de dNTPs mitocondriales equilibrado [91]. Las variantes patogénicas en estos genes resultan en defectos secundarios del ADNmt.

El síndrome de depleción y deleciones múltiples del ADNmt (SDDM) engloba todos aquellos síndromes debidos a defectos en la replicación del ADNmt. Este grupo de enfermedades, también conocidas como defectos en el mantenimiento del ADNmt, tiene como consecuencia una síntesis incorrecta del ADNmt, causando defectos cuantitativos (depleción o descenso en el número de copias de ADNmt) [92] o cualitativos (generando mutaciones puntuales o deleciones múltiples del ADNmt) [93]. Se deben a mutaciones en los genes nucleares implicados de algún modo en la replicación del ADNmt, incluyendo los genes relacionados con el replisoma del ADNmt, el desequilibrio en la homeostasis de los dNTPs, el desbalance en la dinámica mitocondrial o de relación desconocida con el mantenimiento del ADNmt. El primer hallazgo de deficiencia en una enzima asociada a alteraciones en el ADNmt fue en el año 1999 [94]. Concretamente se trataba de la enzima catabólica citosólica TP cuya deficiencia daba lugar a depleción, deleciones múltiples y mutaciones puntuales en el ADNmt. Estas condiciones genéticas causaban un síndrome progresivo multiorgánico conocido como encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE).

Posteriormente a la identificación de mutaciones en TP como causantes de SDDM, han sido identificados otros genes afectando a distintos procesos relacionados con la replicación del ADNmt (ver genes asociados a SDDM más adelante).

Los defectos en el mantenimiento del ADNmt clásicamente se han clasificado en dos grupos diferentes de enfermedades: los síndromes de depleción del ADNmt y los síndromes de deleciones múltiples del ADNmt, con presentación bien durante la infancia y de más gravedad, o más leve y con un inicio durante la edad adulta. Clásicamente, los genes afectados se creían asociados preferentemente a una u otra manifestación molecular (depleción o deleciones).

Actualmente, y conforme se ha ido expandiendo el espectro genético y clínico de estas enfermedades, sabemos que tanto la depleción como las deleciones múltiples del ADNmt son manifestaciones que se producen a través de un mismo patomecanismo y que en los defectos de casi todos los genes asociados con estas enfermedades se pueden dar ambas alteraciones. Es por eso que hoy en día se clasifican en un mismo grupo y se entienden de forma unitaria como síndromes con un amplio espectro y variedad clínica [95].

2.1. Características clínicas de los SDDM

Como hemos mencionado anteriormente, el SDDM se caracteriza por alteraciones en el ADNmt y la consecuente disfunción mitocondrial de los tejidos afectados (Ilustración 5). Sin embargo, la clínica del SDDM es muy compleja y heterogénea. Estas enfermedades se asocian a un amplio espectro fenotípico, afectando a diferentes órganos y muchas veces con implicación multisistémica [96]. Las manifestaciones clínicas tienen un espectro continuo, desde presentaciones leves de aparición en la edad adulta, a presentaciones muy graves y de aparición infantil. Alteraciones en un mismo gen dan lugar a menudo a presentaciones clínicas muy variables, y a su vez, presentaciones clínicas similares pueden tener distinto origen genético. Todos estos factores dificultan el diagnóstico y clasificación clínica de los SDDM. Aun así podemos distinguir cuatro grandes grupos de presentaciones clínicas más frecuentes [97]:

2.1.1. Oftalmoplegia externa progresiva (PEO)

El PEO es muy frecuente en enfermedades mitocondriales. La característica principal de esta enfermedad es la implicación del músculo extraocular, presentando ptosis bilateral con limitaciones en el movimiento de los ojos. Es una encefalopatía de aparición tardía, los primeros síntomas suelen aparecer entre los 20 y 40 años. Frecuentemente los pacientes presentan una debilitación progresiva del músculo externo del ojo (oftalmoparesis), debilitación del músculo proximal e intolerancia al ejercicio. Esta enfermedad puede derivar también en problemas neuromusculares y neurológicos. Molecularmente suele manifestarse con presencia de deleciones múltiples del ADNmt [98].

2.1.2. Encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE)

El MNGIE es una enfermedad autosómica recesiva multisistémica. Presenta una combinación de características donde las manifestaciones gastrointestinales (dismotilidad, diarrea, pseudo-obstrucción...) son las más destacadas y debilitantes. La neuropatía periférica, caquexia y PEO también suelen estar relacionados con el MNGIE. Es una enfermedad grave con una edad media de aparición de 19 años, y una supervivencia de 38 años. Se caracteriza por la acumulación combinada de deleciones múltiples, mutaciones puntuales y depleción del ADNmt. El MNGIE es

debido a mutaciones en el gen *TYMP* aunque síndromes con similitud fenotípica (*MNGIE-like*) han sido asociados también a mutaciones en otros genes [99, 100].

2.1.3. Síndromes de espectro neurológico recesivo

Dentro de este grupo podemos encontrar distintos síndromes neurológicos de gravedad variable y fenotipos solapantes con depleción o deleciones múltiples en el ADNmt. Uno de los más comunes es el síndrome de Alpers-Huttenlocher, una polidistrofia hepática de aparición temprana y pronóstico grave, que comporta daño hepático progresivo y daños neurológicos irreparables. Suele estar asociado a depleción del ADNmt en los tejidos afectados. El síndrome de SANDO es una neuropatía atáxica sensitiva, con disartria y oftalmoplegia. Se hereda de forma autosómica recesiva de aparición infantil o juvenil, con síndromes progresivos de ataxia sensitiva con o sin epilepsia. El síndrome de SCAE es una ataxia epiléptica espinocerebelosa con o sin oftalmoplegia externa. Estos síndromes están principalmente relacionados con mutaciones recesivas en *POLG* [101].

2.1.4. Síndromes de depleción del ADNmt órgano-específica

Son clínica y genéticamente muy heterogéneos. Suelen ser de aparición temprana y herencia autosómica recesiva y presentan un alto grado de depleción en el ADNmt. Aunque también pueden ser multisistémicos, habitualmente afectan de forma específica a uno o varios de estos órganos: músculo, cerebro o hígado. En función de los órganos afectados podemos clasificarlos primordialmente en tres formas: miopáticas, encefalomiopáticas o hepatocerebrales.

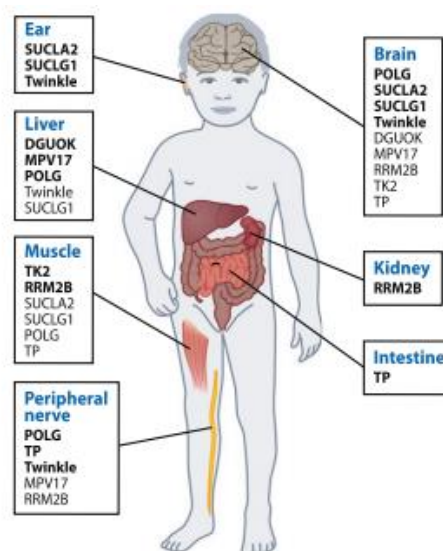


Ilustración 5. Órganos afectados por el SDDM. Los signos y síntomas del SDDM pueden aparecer en diferentes órganos dependiendo del gen afectado (imagen de A. Soumalainen and P. Isohanni, *Neuromuscular disorders*, 2010 [102]).

Como hemos visto, según los genes implicados se ven más afectados unos tejidos u otros. La razón de ello no parece ser un patrón de expresión diferencial, ya que los genes relacionados con el SDDM se suelen expresar de forma generalizada en todos los tejidos. Entender por qué determinados defectos afectan de forma preferencial a un tejido u otro continúa siendo investigado en la actualidad. En cuanto a los síntomas de cada SDDM, aunque muchos genes se cataloguen como causantes de un tipo de síndrome, el espectro clínico de cada uno de ellos se va ampliando cada vez más con la aparición de nuevos casos clínicos. Es por eso que cada vez es más común encontrarse con genes cuyo espectro clínico está en continua expansión y los síntomas y signos asociados se solapan entre las diferentes enfermedades [102].

2.2. Genes asociados a SDDM

Aunque cada vez son más los genes que se asocian con este grupo de enfermedades, gracias a las nuevas técnicas de secuenciación masiva, hoy en día hay unos 20 genes nucleares se han relacionado con SDDM y por tanto son cruciales para el mantenimiento del ADNmt. En la clasificación que hemos realizado los hemos distribuido en 4 grupos diferentes [97, 103] (Ilustración 6).

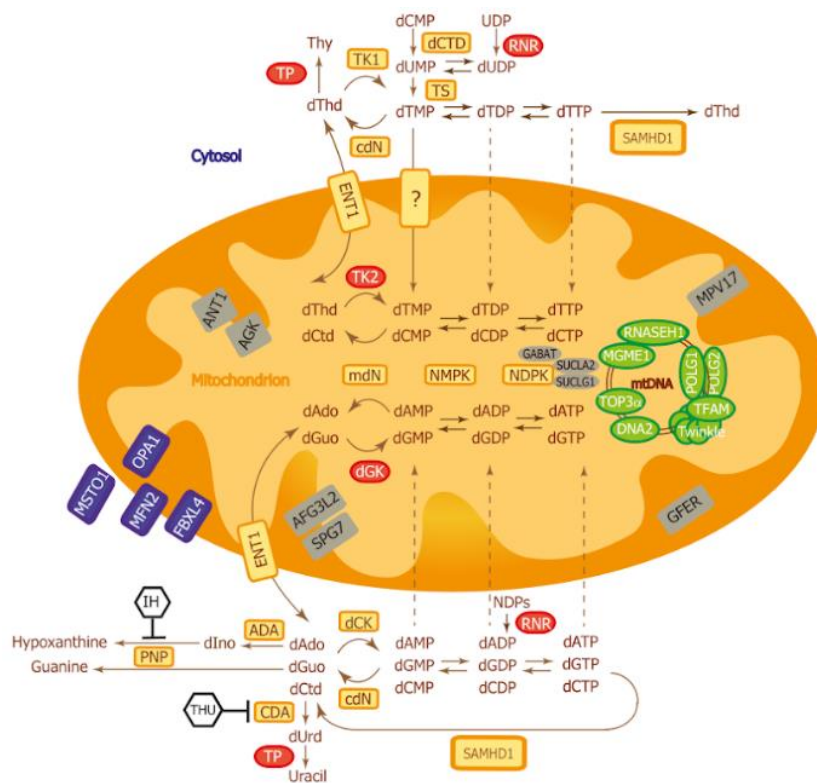


Ilustración 6: Genes afectados en los SDDM y representación de las principales rutas metabólicas involucradas. Las proteínas que han sido relacionadas con los SDDM están marcadas en verde (maquinaria de replicación), en rojo (metabolismo de dNTPs) o en azul (fusión mitocondrial) o en gris (inciden en el mantenimiento de ADNmt mediante un mecanismo desconocido). En amarillo aparecen otras proteínas no relacionadas con los SDDM y en blanco inhibidores específicos del catabolismo de los dNs. ADA: adenosina desaminasa; AFG3L2: subunidad catalítica de la

proteasa m-AAA; AGK: acilglicerol quinasa mitocondrial; ANT1: transportador de nucleótido de adenina mitocondrial en músculo; CDA: citidina desaminasa; cdN: deoxirribonucleotidasa citosólica; dAdo: desoxiadenosina; dCK: desoxicitidina quinasa; dCtd: desoxicitidina; dCTD: dCMP desaminasa; dGK: desoxiguanosina quinasa; dGuo: desoxiguanosina; dIno: desoxiinosina; dThd: timidina; dUrd: desoxiuridina; EHNA, eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina; ENT1: transportador equilibrativo de nucleósidos 1; FBXL4: proteína F-box y rica en repeticiones de leucina 4; GABAT: ácido gamma aminobutírico; GFER: factor de crecimiento estimulador de la regeneración hepática; IH, immucilina H; mdN: desoxirribonucleotidasa mitocondrial; MGME1: exonucleasa 1 para el mantenimiento del genoma mitocondrial; MFN2: mitofusina 2; MSTO1: regulador de la morfología y distribución mitocondrial misato 1; NDPK: nucleótido difosfato quinasa; NMPK: nucleótido monofosfato quinasa; OPA1: atrofia óptica 1; PNP: purina nucleósido fosforilasa; POLG1: subunidad catalítica de la polγ; POLG2: subunidad accesoria de la polγ; RNASEH1: ribonucleasa H1; RNR: ribonucleótido reductasa; SAMHD1: proteína 1 con dominio SAM y HD; SPG7: proteína componente de la proteasa m-AAA; TFAM: factor A de transcripción; THU, tetrahidouridina; TK1: timidina quinasa 1; TK2: timidina quinasa 2; TOP3α: topoisomerasa 1 mitocondrial; TP: timidina fosforilasa; TPI, tipiracil; TS: timidilato sintasa (imagen modificada de Y. Cámara et al, *Drug Discovery Today*, 2013 [104]).

2.2.1. Defectos en genes que codifican enzimas de la maquinaria de replicación del ADNmt

Podemos clasificar las enfermedades debidas a mutaciones en genes relacionados con la replicación del ADNmt en dos grupos. Por un lado, encontramos los genes con función en la propia polimerización del ADNmt, donde encontramos a la pol γ (codificada por *POLG* y *POLG2*), la helicasa Twinkle (codificada por *TWINK*) y TFAM, necesario para comenzar la síntesis (codificado por *TFAM*). En el segundo grupo encontramos todos aquellos genes involucrados en la reparación y maduración de las nuevas hebras sintetizadas de ADNmt así como la finalización de la replicación. En este grupo encontramos a la RNasa H1 (codificado por *RNASEH1*), MGME1 (codificado por *MGME1*) y DNA2 (codificado por *DNA2*). En la Tabla 1 encontramos la lista de todos los genes que se encuentran en estos dos grupos y el primer artículo en el que se describió su relación con SDDM así como su año de publicación.

Defectos en la polimerización del ADNmt

Las mutaciones en *POLG* son la mayor causa de SDDM, habiéndose descrito alrededor de 300 variantes patogénicas en este gen (<http://tools.niehs.nih.gov/polg/>). Las variantes patogénicas en *POLG* son muy polimórficas y con un amplio espectro de presentación, variando su edad de aparición así como la afectación de órganos o síntomas [105, 106] [107] [108]. Suelen dar lugar a una reducción en la actividad de pol γ pudiendo llevarla a un estancamiento en la horquilla de replicación. La gravedad de las enfermedades suele variar en función de la mutación, pero muchas veces una misma mutación da lugar a diferentes síndromes [109, 110], algo común en SDDM (más información en el apartado de introducción 3.2.1).

Las mutaciones en *POLG2* pueden dar lugar a una disminución en la afinidad y una alteración de la interacción entre la subunidad accesoria p55 con la subunidad catalítica p140. Como consecuencia, tendremos una procesividad de la pol γ reducida que puede dar lugar a un estancamiento en la horquilla de replicación [111, 112]. Se han descrito algunas mutaciones dominantes heterocigotas en *POLG2* en pacientes con un amplio espectro de fenotipos

incluyendo sobre todo PEO [113], pero también miopatía, hipotonía, hepatopatía, neuropatía sensorial, ataxia y Parkinson [114, 115].

Variantes patogénicas en *TWINK*, anteriormente denominado como *C10orf2*, afectan su actividad helicasa dando lugar a un estancamiento en la replicación y acumulación de deleciones múltiples del ADNmt [116]. Cuando las mutaciones son monoalélicas, suelen ser dominantes y con aparición en la edad adulta, con presentaciones clínicas de PEO y ptosis mayoritariamente. Otra de las apariciones comunes es la miopatía. Las mutaciones bialélicas son de peor pronóstico con comienzos de la enfermedad sobre los 1-2 años. Suelen estar asociadas a ataxia espinocerebelar de aparición infantil (IOSCA) y síndromes hepatocerebrales, asociadas ambas con depleción del ADNmt [117-119].

TFAM es crítico para la replicación del ADNmt tanto por su rol en la producción del ARN *primer* como en la compactación del ADNmt y su organización en el nucleoide [120]. Es por ello que variantes patogénicas en *TFAM* se relacionan con una disminución en el número de nucleoides y síntesis del ADNmt defectuosa. Se ha descrito una variante patogénica en homocigosis en *TFAM* en dos hermanas con retraso en el crecimiento intrauterino y daño hepático, con muerte en la infancia. Presentaban depleción del ADNmt en músculo e hígado [121].

Una vez las nuevas moléculas de DNA se han sintetizado, éstas deben ser distribuidas a lo largo de la red mitocondrial, pero los mecanismos que intervienen en este proceso se desconocen. Estas nuevas moléculas formarían estructuras complejas encadenadas a la molécula parental que necesitarían de la acción de varias proteínas para resolverse en moléculas independientes. Recientemente, se ha asociado a la topoisomerasa 3 α con la resolución de estas estructuras [122].

Defectos en nucleasas mitocondriales

RNASEH1 codifica las isoformas de RNAasa H1 endorribonucleasa nucleares y mitocondriales, que hidrolizan las hebras de ARN de los híbridos de ARN-ADN. Las variantes patogénicas en *RNASEH1* se relacionaron con una reducción en la capacidad de eliminar los *primers* de ARN, dando lugar a una disminución y estancamiento en la replicación del ADNmt [123]. Los fenotipos más frecuentes son el PEO y la intolerancia al ejercicio. A medida que la enfermedad progresa, podemos encontrar debilidad muscular y acumulación de deleciones múltiples del ADNmt [123].

MGME1 codifica la flipasa mitocondrial MGME1. Se ha propuesto que variantes patogénicas en este gen podrían inhabilitar la eliminación de los intermediarios unidos, dando lugar a una replicación del ADNmt defectuosa [124]. Se han identificado variantes bialélicas en *MGME1* en

pacientes con miopatía y PEO así como depleción y deleciones en el ADNmt [125]. Más recientemente se ha descrito una deleción en homocigosis de un paciente infantil con aparición temprana de ataxia cerebral progresiva [126].

También se han descrito mutaciones monoalélicas en *DNA2*. Estas variantes patogénicas en *DNA2* son de herencia dominante y están asociadas a miopatía y deleciones múltiples del ADNmt en el músculo [127, 128].

Tabla 1. Genes asociados a SDDM y que forman parte de la maquinaria de replicación del ADNmt.

Gen/Proteína	ID gen en NCBI	Herencia	Afectación del ADNmt	Referencias	Año
<i>POLG</i> / <i>POLG</i>	5428	AR/AD	Depleción/Deleciones/ Mutaciones puntuales	[129]	2001
<i>POLG2</i> / <i>POLG2</i>	11232	AD	Deleciones	[130]	2006
<i>TWINK</i> / <i>Twinkle</i>	56652	AR/AD	Depleción/Deleciones	[131]	2001
<i>TFAM</i> / <i>TFAM</i>	7019	AR	Depleción	[121]	2016
<i>RNASEH1</i> / <i>RNaseH1</i>	246243	AR	Depleción/Deleciones	[123]	2015
<i>MGME1</i> / <i>MGME1</i>	92667	AR	Depleción/Deleciones	[125]	2013
<i>DNA2</i> / <i>DNA2</i>	1763	AR/AD	Deleciones	[127]	2013
<i>TOP3A</i> / <i>TOP3α</i>	7156	AR	Deleciones	[122]	2018

2.2.2. Defectos en genes que codifican proteínas necesarias en el mantenimiento de la homeostasis del *pool* de dNTPs mitocondriales

Como hemos visto, el *pool* de nucleótidos mitocondriales está muy bien regulado y los defectos en enzimas implicadas en el metabolismo de nucleótidos tanto mitocondriales como citosólicos, así como transportadores de nucleótidos entre ambos compartimentos, pueden afectar su correcta homeostasis. Tanto defectos en el catabolismo como en el anabolismo de nucleótidos provocan alteraciones en la replicación del ADNmt. Sabemos que en ambos casos, la causa última del desbalance comporta la insuficiencia de uno o varios dNTPs y esto compromete la síntesis de ADNmt [48]. En la Tabla 2 encontramos la lista de todos los genes que se encuentran en este grupo y el primer artículo en el que se describió su relación con SDDM así como el año de su publicación.

Defectos en la ruta mitocondrial de salvamento de dNTPs

Todos aquellos genes que codifican enzimas metabólicas que se encargan de la síntesis de dNTPs dentro de la mitocondria a través de la ruta de salvamento, son esenciales en el mantenimiento del *pool* de dNTPs mitocondrial. En este grupo tendremos la TK2 y la dGK (codificadas por *TK2* y *DGUOK* respectivamente) que se encargan de catalizar la primera fosforilación de los dNs pirimidínicos y purínicos respectivamente. Defectos en *DGUOK* y *TK2* conllevan la insuficiencia mitocondrial de dNTPs de purina y pirimidina respectivamente.

Mutaciones recesivas en *TK2* se han asociado a formas miopáticas de la enfermedad con un amplio espectro de gravedad. La forma de presentación más típica y grave es la disfunción muscular progresiva muchas veces asociada a insuficiencia respiratoria progresiva [132] aunque también existen formas menos graves con debilidad muscular [133-135] más información en el apartado de introducción 3.1.1).

Mutaciones recesivas en *DGUOK* se encuentran habitualmente en asociación con formas severas infantiles hepatocerebrales con afectación multisistémica caracterizada por manifestaciones hepáticas y neurológicas, y con muerte por fallo hepático durante la infancia en muchos de los casos. De forma menos común, existen pacientes con variantes patogénicas recesivas en *DGUOK* con un fallo hepático aislado de aparición durante la infancia y mucho menos grave que la forma multisistémica de la enfermedad. Las mutaciones en *DGUOK* se asocian a depleción del ADNmt en hígado y músculo [136]. Una secuenciación de exoma en pacientes adultos ha revelado que la presencia de mutaciones en *DGUOK* se asocia también con un espectro clínico amplio y acumulación de deleciones múltiples del ADNmt en músculo [137, 138].

Defectos en el metabolismo citosólico de dNTPs

Los genes en este grupo están implicados en el metabolismo citosólico de nucleótidos, tanto en la ruta de salvamento como en la ruta *de novo* y son importantes para mantener la homeostasis de nucleótidos citosólicos y también mitocondriales, dado que el *pool* de nucleótidos mitocondriales depende, en parte, de los nucleótidos importados del citosol.

El gen *RRM2B* codifica la subunidad pequeña p53-inducible de la RNR, y se expresa durante todo el ciclo celular. La identificación de mutaciones en este gen puso en evidencia la importancia de la ruta *de novo* para el mantenimiento del ADNmt [52]. Variantes patogénicas en *RRM2B* están asociadas a un amplio espectro de gravedad de la enfermedad. Podemos encontrar desde fenotipos poco graves con mutaciones dominantes en edades adultas y relacionadas con casos de adPEO [139, 140], a fenotipos de mayor gravedad relacionados con mutaciones recesivas encontradas en casos infantiles con síndrome neuromuscular y depleción del ADNmt [52]. Se ha visto que en este caso existe una correlación entre el genotipo y el fenotipo al que da lugar la mutación [141].

El gen *TYMP* codifica la TP. Defectos en este gen dan lugar a una acumulación sistémica de sus sustratos (dThd y dUrd) [142] y por consiguiente un desbalance en el *pool* de dNTPs que dando lugar a una insuficiencia en el dCTP [48, 143] se traduce en inestabilidad del ADNmt [144]. Variantes patogénicas recesivas en *TYMP* están asociadas al MNGIE, caracterizado por una dismotilidad gastrointestinal con caquexia, oftalmoplegia, neuropatía periférica y miopatía.

Normalmente se presenta antes de los 20 años y está caracterizado por deleciones múltiples, mutaciones puntuales y depleción del ADNmt del músculo.

Tabla 2. Genes asociados a SDDM y que participan en metabolismo de dNTPs.

Gen/Proteína	ID gen en NCBI	Herencia	Afectación ADNmt	Referencias	Año
<i>TK2/TK2</i>	7084	AR	Depleción/Deleciones	[145]	2001
<i>DGUOK/dGK</i>	1716	AR	Depleción/Deleciones	[146]	2001
<i>TYMP/TP</i>	1890	AR	Depleción/Deleciones/ Mutaciones puntuales	[94]	1999
<i>RRM2B/P53R2</i>	50484	AR/AD	Depleción/Deleciones	[52]	2007

2.2.3. Genes que codifican proteínas involucradas en la fusión mitocondrial

Variantes patogénicas en genes como *OPA1*, *MFN2* y *FBXL4* dan lugar a unas dinámicas mitocondriales defectuosas con fragmentación mitocondrial y alteraciones en la producción de energía. Esto también afecta a la mezcla del contenido intramitocondrial y provoca variaciones en el proteoma dentro de las poblaciones mitocondriales. Esta heterogeneidad en los proteomas mitocondriales puede dar lugar a un desequilibrio en las enzimas necesarias para la síntesis del ADNmt, que necesitan de una precisa estequiometría para la eficiente síntesis de ADNmt [147, 148]. En la Tabla 3 encontramos la lista de todos los genes que se encuentran en este grupo y el primer artículo en el que se describió su relación con SDDM así como el año de publicación.

OPA1 codifica la proteína OPA1. Defectos en *OPA1* dan lugar a la inhibición de la replicación de ADNmt y a la alteración de la distribución de nucleoides en la mitocondria resultando en una agregación de los mismos [149]. Variantes patogénicas en *OPA1* están asociadas con atrofia óptica no sincrónica autosómica dominante, con deleciones múltiples del ADNmt en el músculo. Otras variantes patogénicas recesivas en *OPA1* se han asociado con el síndrome de Behr, encefalomiopatía y depleción en el ADNmt del músculo [150, 151].

MFN2 codifica la MFN2, y se ha encontrado en asociación con mutaciones en *OPA1* en pacientes con acumulación de deleciones múltiples del ADNmt en el músculo [152]. La atrofia óptica y el síndrome Charcot-Marie-Tooth también son fenotipos que podemos encontrar por mutaciones dominantes en este gen y dando lugar a deleciones en el ADNmt [153, 154].

FBXL4 codifica la FBXL4. Defectos en este gen dan lugar a una disfunción mitocondrial por depleción del ADNmt y desequilibrio de la red mitocondrial [155]. Variantes patogénicas en

FBXL4 se han descrito recientemente asociadas a encefalomiopatía y a un retraso en el desarrollo global [156].

MSTO1, codificada por el gen *MSTO1*, es una proteína cuya disfunción impide el proceso de fusión mitocondrial causando miopatía, ataxia cerebelosa y retinopatía pigmentosa, asociadas a depleción de ADNmt.

Tabla 3. Genes asociados a SDDM y que regulan las dinámicas mitocondriales.

Gen/Proteína	ID gen en NCBI	Herencia	Afectación ADNmt	Referencias	Año
<i>OPA1/OPA1</i>	4976	AR/AD	Depleción/Deleciones	[157] [158]	2008
<i>MFN2/MFN2</i>	9927	AR/AD	Depleción/Deleciones	[152]	2012
<i>FBXL4/FBXL4</i>	26235	AR	Depleción	[159]	2013
<i>MSTO1/MSTO1</i>	55154	AR	Depleción	[160]	2019

2.2.4. Genes que actúan sobre el mantenimiento del ADNmt mediante un mecanismo no identificado

El resto de genes asociados por el momento a SDDM podemos clasificarlo en un cuarto grupo de genes que por mecanismos aún desconocidos también afectan al mantenimiento del ADNmt. En modelos animales de algunas de estas deficiencias se ha documentado un desequilibrio en el *pool* de dNTPs. Por este motivo, en algunas revisiones bibliográficas algunos de los genes de este grupo se clasifican como relacionados con la homeostasis de dNTPs. En la mayoría de casos no se ha probado relación directa de estas proteínas con metabolismo de dNTPs por lo que en este trabajo los incluimos en este cuarto grupo. En la Tabla 4 encontramos la lista de todos los genes que se encuentran en este grupo y el primer artículo en el que se describió su relación con SDDM así como el año de publicación.

La enzima SUCL está compuesta por las subunidades α (codificada por *SUCLG1*) y β (codificada por *SUCLA2* o *SUCLG1*). Mutaciones recesivas en *SUCLG1* se han asociado a encefalomiopatía con hipotonía, atrofia muscular y retraso en el desarrollo [161]. Mutaciones recesivas en *SUCLA2* también se han asociado a encefalomiopatía con presentación en la infancia y retraso en el desarrollo, hipotonía, distonía y atrofia muscular. En ambos casos se ha observado depleción del ADNmt en el músculo [162].

La enzima GABAT está codificada por *ABAT*. Variantes patogénicas en este gen dan lugar a deficiencia en GABAT, una enfermedad poco común que eleva los niveles de GABA en el líquido cefalorraquídeo dando lugar a encefalomiopatía [163].

SLC25A4 codifica ANT1, la isoforma específica de músculo del translocador del nucleótido de adenina (ANT) mitocondrial. Esta proteína intercambia ADP por ATP desde el citosol hacia la matriz mitocondrial, garantizando la disponibilidad del sustrato para la fosforilación oxidativa (aunque puede funcionar de forma reversa en condiciones glicolíticas donde juega un papel importante manteniendo el potencial de membrana). La deficiencia en ANT1 da lugar a un desequilibrio OXPHOS y en la producción de energía [164]. Las variantes patogénicas en *SLC25A4* pueden ser dominantes o recesivas y siempre se han encontrado asociadas a deleciones múltiples del ADNmt en el músculo. Las mutaciones dominantes, suelen ser de aparición adulta y se manifiestan como adPEO, intolerancia al ejercicio y debilidad muscular [165-167]. Las mutaciones recesivas en cambio suelen aparecer a edades infantiles y asociadas a cardiomiopatía hipertrófica y miopatía [168]. También se han encontrado casos de cardiomiopatía hipertrófica causada por mutaciones dominantes en *SLC25A4* [169].

La acilglicerol quinasa mitocondrial (AGK) está codificada por *AGK*. La deficiencia en AGK da lugar a una perturbación en la composición de la membrana lipídica dentro de la mitocondria. Dado que ANT1 está unida a esta membrana lipídica, deficiencias en AGK afectan al ensamblaje y estabilidad de ANT1 [170]. Variantes patogénicas en AGK, se han asociado con el síndrome de Sengers, una enfermedad autosómica recesiva que tiene presentación neonatal [171].

El gen *MPV17* codifica una pequeña proteína de la membrana mitocondrial interna (MPV17). Variantes patogénicas en este gen dan lugar a una disminución de los dNTPs mitocondriales y afectación de la síntesis de ADNmt ralentizando su replicación [172-174]. Mutaciones en este gen están asociadas a encefalohepatopatía, caracterizada por disfunción hepática e implicación neurológica con retraso en el desarrollo. La disfunción hepática suele progresar a fallo hepático, que sin un trasplante dará lugar a muerte durante la infancia. Las mutaciones recesivas en *MPV17* también se asocian a miopatía con PEO en edades adultas, con deleciones múltiples del ADNmt [175-177].

El gen *GFER* codifica el factor de crecimiento estimulador de la regeneración hepática (*GFER*, *Growth factor, augmenter of liver regeneration*). *GFER* participa en el importe de proteínas ricas en cisteína al espacio intermembrana. Se han identificado mutaciones en *GFER* en una familia consanguínea donde los individuos afectados sufrían una deficiencia mitocondrial en la infancia con miopatía progresiva, cataratas congénitas, sordera sensorineural, y retraso del desarrollo. Los pacientes mostraban deficiencia combinada de la CTE y deleciones múltiples en el ADNmt [178].

AFG3L2 y *SPG7* codifican para proteínas constituyentes de la AAA-m-proteasa, un sistema ATP-dependiente asociado a la membrana mitocondrial interna que se encarga de eliminar proteínas de forma controlada ajustando el proteoma mitocondrial a las necesidades funcionales de la célula. Mutaciones en *AFG3L2* se asocian ataxia espinocerebelosa dominante (SCA28) con pérdida de células de Purkinje, mientras que mutaciones en *SPG7* causan una forma recesiva de paraplegia espástica hereditaria (HSP7) con afectación de las neuronas motoras cortico-espinales. Para ambos genes se han descrito casos de PEO asociados a acumulación de deleciones múltiples del ADNmt.

Tabla 4. Genes asociados a SDDM mediante mecanismos no identificados.

Gen/Proteína	ID gen en NCBI	Herencia	Afectación ADNmt	Referencias	Año
<i>SUCLG1/SUCLG1</i>	8802	AR	Depleción	[179]	2007
<i>SUCLA2/SUCLA2</i>	8803	AR	Depleción	[180]	2005
<i>ABAT/GABAT</i>	18	AR	Depleción	[61]	2015
<i>SLC25A4/ANT1</i>	291	AR/AD	Depleción/Deleciones	[164]	2000
<i>AGK/AGK</i>	55750	AR	Depleción	[171]	2014
<i>MPV17/MPV17</i>	4358	AR	Depleción/Deleciones	[175]	2006
<i>AFG3L2</i>	10939	AR	Deleciones	[181]	2015
<i>SPG7</i>	6687	AD	Deleciones	[182]	2014
<i>GFER</i>	2671	AR	Deleciones	[178]	2009

2.3. Modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*

El SDDM abarca un amplio rango de fenotipos como ya hemos visto. Esto hace que sea muy difícil el estudio de estas enfermedades únicamente con la información que obtenemos de los pacientes. Para avanzar en el estudio y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para estas enfermedades, es importante el uso de modelos experimentales para entender mejor los mecanismos y la progresión de la enfermedad. Una de las limitaciones que nos encontramos, es la baja disponibilidad de estos modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, y su poca fidelidad a la hora de reproducir el fenotipo clínico humano.

Como hemos visto anteriormente el SDDM afectan muchas veces de forma específica más a unos órganos que a otros dando lugar a variaciones cuantitativas o cualitativas en el ADNmt. Una parte importante del SDDM se debe a defectos en el metabolismo de dNTPs. Las células y tejidos serán especialmente vulnerables en su estado post-mitótico cuando el *pool* de dNTPs celular se encuentra muy reducido. Bajo estas condiciones, el *pool* de dNTPs dependerá fundamentalmente de la ruta de salvamento, forzando así una replicación del ADNmt basada

principalmente en esta ruta de síntesis. Para simular mejor estos estados, cuando trabajemos con cultivos celulares será importante inducir y mantener las células en quiescencia.

Los tipos celulares con los que sería óptimo trabajar en el estudio de SDDM serían el hígado, el cerebro o el músculo, siendo una limitación la dificultad en la obtención, diferenciación y manipulación de estas muestras. De todos estos, los cultivos de células musculares han sido los más utilizados. Se han utilizado tanto mioblastos como miotubos (obtenidos a partir de la diferenciación de mioblastos en cultivo). Aunque muchas proteínas específicas del músculo se expresan en los miotubos que se encuentran en estado post-mitótico, y no en los mioblastos que actúan como precursores y se encuentran en división [183-185], la diferenciación en cultivos implica la pérdida de muchos factores esenciales para la funcionalidad del tejido.

En los cultivos celulares, otra limitación importante viene dada por la necesidad de introducir las variantes patogénicas que permitan el estudio de SDDM. Por este motivo, el modelo *in vitro* más utilizado es el de cultivos primarios derivados de pacientes, concretamente los fibroblastos de piel dada la facilidad para su obtención. Sin embargo, no son el modelo más adecuado. A pesar de que los pacientes sí que presenten depleción o deleciones en el ADNmt en diferentes órganos, los fibroblastos de piel no suelen manifestar estas alteraciones. Una excepción son los fibroblastos deficientes en dGK, que de forma espontánea sufren una depleción del ADNmt cuando se encuentran en estado quiescente [186]. También se ha utilizado la transformación de fibroblastos a mioblastos mediante la expresión del factor de diferenciación MyoD. En algunos casos, esta estrategia permite obtener células que manifiestan depleción del ADNmt [184].

Otra opción para forzar la depleción del ADNmt en cultivos primarios, es el uso de agentes que interfieran de forma transitoria en la replicación del ADNmt forzando su depleción, como es el caso del bromuro de etidio (BrEt) o algunos análogos de dNs. Tras su retirada del medio de cultivo, se analiza la velocidad o capacidad de las células para recuperar el número inicial de copias de ADNmt [183, 187, 188].

En cuanto a los modelos animales para los SDDM, se han generado en varias especies como *Caenorhabditis elegans* [189], *zebrafish* (*Danio rerio*) como modelos de las deficiencias en POLG [190], MPV17 [191, 192] y dGK [193], o en rata (*Rattus Norvegicus*) para la deficiencia en dGK [194], siendo los modelos en ratón (*Mus Musculus*) los más comunes [195]. Existen muchos modelos murinos útiles que replican las deficiencias en la replicación mitocondrial (Tabla 5). Algunos de los modelos fueron generados antes de conocer su relación con los SDDM, caracterizándose la presencia de depleción o deleciones en el ADNmt *a posteriori*.

Tabla 5. Modelos de SDDM en ratón (tabla modificada de H.Tynnismaa, A. Soumalainen, *Methods*, 2010 [195]) ordenados por año de publicación.

Gen mutado	Tipo de modificación genética	Afectación del ADNmt	Referencia	Año de publicación
<i>Mpv17</i>	<i>Mpv17</i> ^{-/-}	Depleción en hígado, músculo, riñón y cerebro	[196] [175]	1990
<i>Ant1</i>	<i>Ant1</i> ^{-/-}	Deleciones múltiples en músculo y corazón	[197]	1997
<i>Rrm2b</i>	<i>Rrm2b</i> ^{-/-}	Depleción en riñones, músculo e hígado	[198] [52]	2003
<i>Rnaseh1</i>	<i>Rnaseh1</i> ^{-/-}	<i>Letal en estado embrionario</i>	[199]	2003
<i>Polg</i>	<i>Polg</i> ^{-/-}	Depleción, <i>letal en estado embrionario</i>	[200]	2005
<i>Twinkle</i>	<i>Twinkle</i> ^{dup353-365}	Deleciones múltiples en músculo y cerebro	[201]	2005
<i>Opa1</i>	<i>Opa1</i> ^{enu/+}	No se detectan	[202]	2007
<i>Polg</i>	<i>Polg</i> ^{Y955C}	Depleción en corazón	[203]	2007
<i>Tk2</i>	<i>Tk2</i> ^{-/-}	Depleción en cerebro, músculo, riñón, corazón y médula espinal	[204]	2008
<i>Tk2</i>	<i>Tk2</i> ^{H126N}	Depleción en músculo, cerebro, corazón, hígado, bazo y tejido adiposo	[205]	2008
<i>Tymp</i>	<i>Tymp</i> ^{-/-} <i>Upp1</i> ^{-/-}	Depleción en cerebro	[206]	2009
<i>Polg2</i>	<i>Polg2</i> ^{-/-}	Depleción, <i>letal en estado embrionario</i>	[207]	2013
<i>Twinkle</i>	<i>Twinkle</i> ^{Y509C}	Depleción en hígado	[208]	2016
<i>Mgme1</i>	<i>Mgme1</i> ^{-/-}	Depleción y deleciones múltiples en cerebro, hígado, músculo y riñones	[209]	2018
<i>Dguok</i>	<i>Dguok</i> ^{-/-}	Depleción principalmente en hígado	[210]	2019

A pesar de las diferencias que existen entre humanos y ratones, los modelos experimentales en ratón son una herramienta muy importante para validar tratamientos para estas enfermedades y entender mejor sus patomecanismos. La lista creciente de modelos murinos disponibles evidencia que estos no siempre reproducen el fenotipo clínico de los pacientes [211], por tanto, es importante un análisis exhaustivo del modelo con el que vamos a trabajar para saber si es adecuado para el estudio que queremos realizar en cada caso.

2.4. Aproximaciones terapéuticas para los SDDM

Muchos de los defectos en el mantenimiento del ADNmt son enfermedades graves con mal pronóstico y hoy en día no existe ninguna terapia para poder curarlas o tratarlas eficazmente, aunque se están realizando avances importantes en este sentido. El hecho de que en la mayoría de los casos tengan afectación multiorgánica exige una evaluación completa de expertos

multidisciplinarios para poder determinar la afectación de cada uno de los órganos. Además, el diagnóstico de estos pacientes no suele ser fácil, dificultando y retrasando así su posible tratamiento.

Existen algunos suplementos dietéticos comunes en el tratamiento de otras enfermedades mitocondriales que pueden ayudar a modular algunos de los síntomas. El ácido fólico y otros suplementos que promueven la función mitocondrial como los antioxidantes, vitaminas o agentes inductores de la biogénesis mitocondrial suelen ser utilizados, aunque hay poca evidencia de su efectividad [212, 213].

Otra de las estrategias que se suele llevar a cabo en aquellos casos con fallo hepático, es el trasplante de hígado aunque no está recomendado en todos los casos. Tratándose de enfermedades multiorgánicas, una gestión eficaz en un solo órgano no evita la progresión de la enfermedad en el resto de los órganos que estén afectados [214, 215].

Para la enfermedad del MNGIE se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas a lo largo del tiempo como la hemodiálisis [216] y el trasplante de células madre alogénicas hematopoyéticas [217] [218]. Actualmente en estudios preclínicos se encuentran la terapia de reemplazo enzimático [219, 220] y la terapia génica que consigue restablecer el equilibrio bioquímico de la dThd y la dUrd [221]. Para la deficiencia en MPV17 también se han realizado estudios preclínicos para poder aplicar la terapia génica, con resultados prometedores que restablecen los niveles de ADNmt en el hígado [222].

Recientemente, la suplementación con dNs como estrategia farmacológica para el tratamiento del SDDM está acaparando mucha atención debido en gran parte, a su éxito en los pacientes deficientes en TK2 (ver apartado de resultados 3.1.3). Esta estrategia en la que se ha centrado el trabajo de esta tesis la desarrollaremos con más profundidad en el próximo apartado.

3. Administración de dNs como estrategia para tratar los SDDM

En el año 2003 se realizaron los primeros ensayos pre-clínicos para algunos defectos en el mantenimiento del ADNmt causados por defectos enzimáticos [186]. Esta estrategia consiste en la administración de dNs como terapia para promover la síntesis de dNTPs a través de la ruta de salvamento [104, 223]. En primer lugar, la idea de este tratamiento consistía en la administración del producto de la reacción catalizada por el enzima deficiente en cada caso. Concretamente se empezó trabajando con células derivadas de pacientes con mutaciones en dGK, enzima que cataliza la primera reacción de fosforilación de dNs de purinas en la ruta de

salvamento dentro de la mitocondria. La dGK fosforila la dAdo y dGuo a dAMP y dGMP, respectivamente. Con la adición de los dos productos de reacción al medio de cultivo en experimentos *in vitro*, se consiguió prevenir la depleción del ADNmt en estas células [183-186]. Esta estrategia basada en los dNMP también se utilizó en experimentos *in vitro* para otros SDDM como las deficiencias en POLG, TYMP ó RRM2B para rescatar el ADNmt deplecionado [183, 184]. No obstante, los dNMPs son compuestos iónicos que por tanto, no pueden atravesar membranas celulares sin ayuda de transportadores, y que sólo una vez desfosforilados cruzan la membrana celular en forma de dNs a través de transportadores [223]. De esta forma, son los dNs derivados los que aumentan los niveles de dNTPs actuando como los agentes terapéuticos en la recuperación de los niveles de ADNmt [223]. Estos dNs se fosforilarán a dNTPs por acción de la actividad residual de la enzima deficiente dentro de la ruta de salvamento mitocondrial, o por rutas de salvamento citosólicas. El uso de los dNs como tratamiento para la recuperación del ADNmt se ha utilizado en diferentes modelos *in vitro* demostrando su eficacia [188, 223] [48, 224].

Tal y como hemos visto, dentro de las células los dNs actúan como precursores de los dNTPs, fosforilándose a través de las rutas de salvamento citosólica y mitocondrial. Esta ruta de síntesis será la encargada principal de mantener un *pool* de dNTPs suficiente para la replicación y reparación del ADNmt dentro de la mitocondria cuando la célula no se encuentre en división. Tanto el citosol como la matriz mitocondrial, a pesar de tratarse de compartimentos separados, tienen una buena comunicación a través de diferentes transportadores. Durante la realización de esta tesis, hemos estudiado cómo la suplementación de dNs y el consecuente aumento de los niveles de dNTP en las células, puede utilizarse como estrategia terapéutica para las deficiencias en TK2 y POLG.

3.1. Tratamiento con dNs para el déficit en TK2

3.1.1. Historia natural de las deficiencias en TK2

En el año 2001 se identificaron las mutaciones en el gen TK2 como causa genética de una de las formas miopáticas de SDDM en cuatro niños con miopatía severa, defectos en la actividad de la cadena de respiración mitocondrial y depleción en el ADNmt del músculo [145]. Desde entonces se han ido describiendo diferentes casos con una clínica y genética molecular heterogénea. En un reciente estudio retrospectivo que incluye 92 casos de pacientes con deficiencia en TK2, se ha realizado una clasificación fenotípica de la enfermedad que tiene predominante presentación miopática y un amplio espectro tanto de aparición como de gravedad [225].

Centrándonos en los aspectos clínicos, la edad de aparición de la enfermedad en los 92 pacientes incluidos en el estudio va desde el nacimiento a los 72 años, afectando en igual proporción a hombres que a mujeres. Se definieron 3 grupos en función de la edad de aparición: infantil (≤ 1 año), infantil-juvenil (>1 y <12 años) y tardía (≥ 12 años). Todos los pacientes presentaban debilidad en el músculo proximal como primer signo de la enfermedad, afectando a la función motora global en el 82% de los casos, mientras que sólo el 18% de los pacientes tenían una función motora compatible con una vida diaria normal. La respiración en estos casos también está altamente comprometida, con un 65% de los pacientes con necesidad de respiración asistida, aumentando este porcentaje en relación inversa a la edad. El resto de las manifestaciones clínicas encontradas están incluidas en la Ilustración 7.

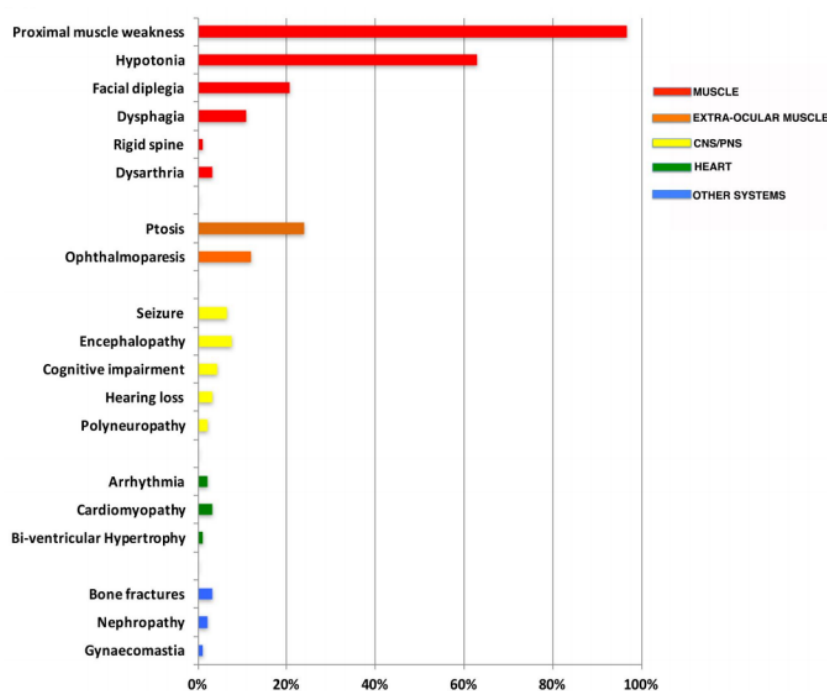


Ilustración 7. Manifestaciones clínicas de los pacientes deficientes en TK2. El gráfico de barras muestra la prevalencia de los síntomas clasificados por órganos y tejidos (imagen de C. Garone, et al, *J Med Genet*, 2018 [225]).

Los resultados de mortalidad obtenidos a partir de 79 individuos se han realizado comparando la aparición infantil de la enfermedad con el grupo combinado de infantil-juvenil + tardía (teniendo en cuenta que su supervivencia es parecida). La supervivencia mediana del primer grupo es de un año tras la aparición de la enfermedad, mientras que la del segundo es de al menos 23 años (Ilustración 8).

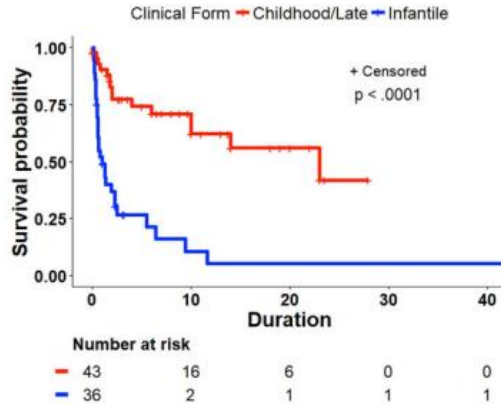


Ilustración 8. Supervivencia después de la aparición de la enfermedad en los pacientes con deficiencia en TK2 (imagen de C. Garone et al, *J Med Genet*, 2018 [225]).

En cuando a los aspectos moleculares y bioquímicos, podemos decir que los niveles de ADNmt en músculo muestran depleción en mayor proporción cuando la aparición de la enfermedad es temprana, y deleciones múltiples cuando la aparición de la enfermedad es tardía. Son muchas las variantes patogénicas encontradas a lo largo del gen *TK2*, siendo la p.Thr108Met la mutación más común, y parece no haber una relación clara entre el genotipo y el fenotipo de la enfermedad (Ilustración 9). Igualmente, la actividad TK2 residual determinada en fibroblastos de algunos de los pacientes, a pesar de estar reducida en comparación con la presente en controles sanos, parece no tener relación con la gravedad de la enfermedad [226].

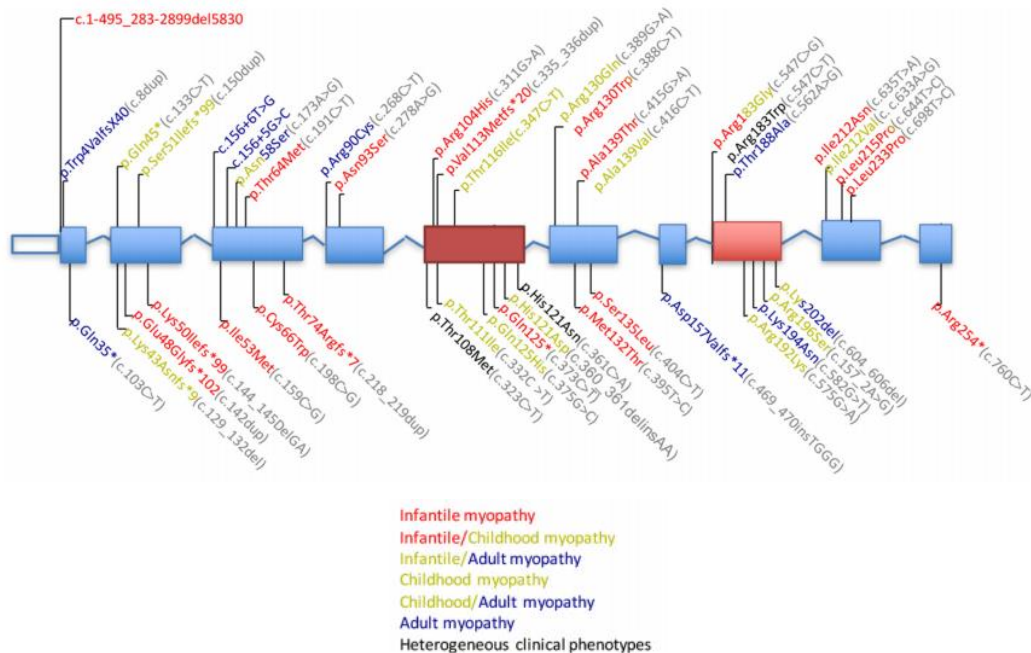


Ilustración 9. Mutaciones descritas en TK2. Los exones marcados en rojo son los que más mutaciones acumulan. Los cambios de aminoácido en la proteína están indicados según un código de colores basado en la aparición clínica del fenotipo. Los cambios en negro se relacionan con las tres formas. Las variantes en las secuencias de ADN aparecen en color gris (imagen de C. Garone et al, *J Med Genet*, 2018 [225]).

3.1.2. Estudios preclínicos en el modelo de ratón

Para el estudio de la deficiencia en TK2 existen dos modelos de ratón que se publicaron simultáneamente. Por un lado, se publicó un modelo KO con un fenotipo muy grave de la enfermedad. Estos ratones tenían una evolución del peso normal durante la primera semana antes de empezar a presentar un retraso en el crecimiento. Los ratones desarrollaban una encefalomiopatía y morían entre la segunda y la tercera semana de vida simulando los casos más graves de la enfermedad en humanos. También se puede observar una depleción del ADNmt en diferentes tejidos y una afectación principalmente encefalopática. La letalidad a edades tempranas es indicativo de que la función de TK2 es imprescindible y que no hay vías alternativas, que puedan suplir o comenzar su falta de función [204]. Por otro lado, se publicó un modelo KI con la mutación H126N. Este modelo también presentaba un fenotipo encefalomiopático indistinguible del del modelo KO [205].

Con el modelo KO para la TK2, se publicaron un par de trabajos donde sobre-expresaban el transgén para la desoxirribonucleósido quinasa de *Drosophila melanogaster* (*Dm-dNK*) recuperando el fenotipo del ratón y alargando su vida hasta por lo menos 20 meses. La *Dm-dNK* se expresa en citosol dónde cataliza la fosforilación de dNs a dNMPs. Estos resultados indican que un aumento en los niveles de dNMPs, dNDPs o dNTPs importados a la mitocondria y provenientes del citosol, pueden compensar la deficiencia de TK2 en los tejidos afectados [227, 228].

Con el modelo KI se comenzó a probar tratamientos primero con dNMP (dTMP y dCMP) [229], y después con dNs (dThd y dCtd) [230], obteniendo resultados positivos similares que demostraban la eficacia del tratamiento. En ambos casos tras la administración del tratamiento se observaba un aumento de la supervivencia, así como la recuperación del ADNmt y de la deficiencia en CTE en algunos órganos.

Durante esta tesis, se ha utilizado el modelo KO para TK2, carente de cualquier actividad TK2, como modelo de estudio para probar el tratamiento basado en la administración dNs. Hemos obtenido resultados similares y complementarios a los obtenidos con el modelo KI además de ahondar en la caracterización metabólica y de los factores que limitan la eficacia terapéutica de los dNs [231]. De forma paralela a la realización de este trabajo y en colaboración con el grupo del Dr. Hirano, se ha desarrollado una investigación complementaria en el modelo KI [232].

3.1.3. Tratamientos experimentales en pacientes

En base a los prometedores resultados preclínicos obtenidos con el tratamiento de dNMPs y dNs en los modelos murinos para la deficiencia en TK2, y dada la falta de terapias para esta

enfermedad devastadora, se aprobó el tratamiento compasivo de dNMP y dNs en pacientes de diversos países. Primeramente, los pacientes empezaron a tomar dNMPs, pero debido a su elevado coste y a que se demostró que el agente terapéutico eran los dNs provenientes de la defosforilación de dNMPs [223], se cambió a la administración de dNs. Se han publicado recientemente los primeros resultados de este tratamiento compasivo que está siendo aplicado en 5 países [233]. En el artículo se presenta el caso de 16 pacientes bajo tratamiento desde por lo menos un año.

Seis de los pacientes iniciaron el tratamiento con dNMPs, pero 5 de ellos pasaron a recibir dNs. La dosis se determinó en función de los estudios preclínicos en ratones y se estableció en un máximo de 400 mg/kg/día dependiendo de la tolerancia, y repartido en varias tomas al día.

En función del fenotipo y espectro clínico de los pacientes, fueron divididos en dos grupos. El primero contenía 5 pacientes con aparición temprana de la enfermedad antes de los 2 años e incapacidad para caminar y/o necesidad de respiración asistida. En el segundo grupo se incluían los 11 pacientes restantes con progresión más lenta de la enfermedad. La supervivencia del primer grupo de pacientes fue comparada con un grupo de 44 pacientes históricos que cumplían los mismos criterios. La supervivencia de los pacientes tratados mejoró drásticamente en comparación con la cohorte de pacientes históricos sin tratamiento. Concretamente a los 2 años después de la aparición de la enfermedad solo el 27,3% del histórico de pacientes sobrevivía, mientras que los 5 pacientes tratados siguen todos vivos y con mejoras objetivas notables en la función motora (Ilustración 10).

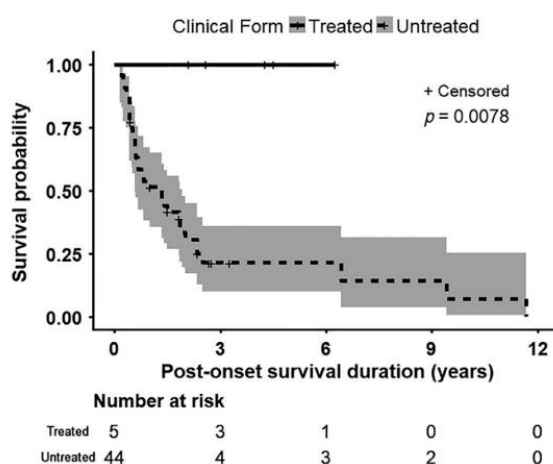


Ilustración 10. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de los pacientes con deficiencia en TK2 tratados o no. Los 5 pacientes con deficiencia en TK2 con miopatía severa de aparición temprana muestran el 100% de supervivencia por lo menos 2 años después del tratamiento. En comparación, el grupo de controles histórico no tratado con deficiencia en TK2 con miopatía severa de aparición temprana muestran un 27,3% de supervivencia a los 2 años después de la aparición de la enfermedad. El sombreado indica los intervalos de confianza del 95% (imagen de *Domínguez-González et al, Ann Neurol, 2019 [233]*).

En cuanto a los resultados obtenidos en el segundo grupo de pacientes con una progresión más lenta de la enfermedad, se observó una estabilización o mejora en las diferentes medidas clínicas que se realizaron. Entre las mejoras más importantes observadas tras la administración del tratamiento se incluyen la recuperación de la capacidad de andar, la interrupción de la nutrición entérica o ventilación asistida requerida antes del uso del tratamiento y la mejoría de la función motora. El único efecto adverso encontrado en los pacientes tratados es una diarrea dosis-dependiente que remite ajustando la dosis y pauta de administración. .

Actualmente se está desarrollando el primer ensayo clínico del tratamiento (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03845712>)

3.2. Tratamiento con dNs para el déficit en POLG

3.2.1. Presentación clínica de las deficiencias en POLG

La deficiencia en POLG es la causa más común de enfermedad mitocondrial, siendo responsable del 10% de casos en adultos de una cohorte australiana [234] y la mayor causa de SDDM [235]. La primera vez que se asoció con deleciones múltiples en el ADNmt fue en el año 2001, con un artículo que describía 4 mutaciones en POLG asociadas a adPEO y arPEO [129]. Desde entonces son muchas las manifestaciones clínicas que se han asociado a variantes patogénicas en POLG y actualmente se relaciona con un amplio espectro de fenotipos que se solapan formando un continuo en el que las formas graves suelen ir asociadas a depleción mientras que las leves lo están a deleciones múltiples (Ilustración 11) La aparición de la enfermedad puede darse desde la infancia a la edad adulta, variando también su gravedad. Las manifestaciones neurológicas son las más comunes y en la última revisión realizada sobre los aspectos clínicos de la enfermedad, se clasifican en 6 síndromes principales [235].

1) Síndrome de Alpers-Huttenlocher (AHS)

Es uno de los fenotipos más graves y está caracterizado por una encefalopatía progresiva y grave con epilepsia intratable y fallo hepático de aparición temprana. También es uno de los fenotipos más comunes presente en el 70% de casos de niños con mutaciones en POLG. Suele presentarse al final de primer año de edad, aunque también durante la infancia o incluso en la edad adulta en casos puntuales. Suele ir asociado a depleción del ADNmt.

2) Espectro infantil miocerebrohepático (MCHS)

Es la presentación más temprana de la enfermedad, presentándose durante los primeros meses de vida con una hipotonía severa, retraso en el desarrollo y discapacidad hepática. Los niños con

esta enfermedad suelen morir antes del año de edad por fallo hepático. Se presenta con depleción de ADNmt.

3) Ataxia sensorial con miopatía epiléptica mioclónica (MEMSA)

Las mutaciones en *POLG* están asociadas a un gran número de fenotipos epilépticos, alcanzando un 80% de los casos en pacientes pediátricos. La MEMSA abarca un grupo de enfermedades con epilepsia, miopatía y ataxia, normalmente sin oftalmoplegia. Dentro de este grupo encontramos enfermedades previamente descritas como la ataxia espinocerebelar con epilepsia (SCAE), ambos caracterizados por tener deleciones múltiples en el ADNmt. Las epilepsias relacionadas con *POLG* pueden imitar los síndromes clásicos mitocondriales de herencia materna como la epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas (MERRF) y la encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios tipo ictus (MELAS).

4) Espectro de ataxia neuropática (ANS)

La ataxia en enfermedades relacionadas con *POLG* puede ser sensorial o cerebelar. Dentro de este grupo se encuentra el síndrome mitocondrial recesivo de ataxia (MIRAS) y neuropatía atáxica sensorial, disartria y oftalmoplegia (SANDO). Dentro de las características clínicas asociadas están la disartria, encefalopatía, oftalmoplegia y neuropatía periférica. También se caracteriza por la aparición de deleciones múltiples en el ADNmt.

5) Oftalmoplegia externa progresiva autosómica recesiva (arPEO)

Está caracterizada por una debilidad progresiva del músculo extraocular dando lugar a ptosis y oftalmoparesis sin implicación sistémica asociada y deleciones múltiples en el ADNmt.

6) Oftalmoplegia externa progresiva autosómica dominante (adPEO)

Normalmente incluye miopatía generalizada y grados variables de pérdida de audición neurosensorial, ataxia, depresión, Parkinson, hipogonadismo y cataratas. También se relaciona igual que la arPEO con deleciones múltiples del ADNmt.

Hay muchos otros síndromes que de manera más puntual también se relacionan con mutaciones en *POLG*. La neuropatía, un fenotipo parecido al del MNGIE (característico de pacientes con mutaciones la *TYMP*) o los síndromes del trastorno del movimiento como el Parkinson, son algunos de los ejemplos más comunes.

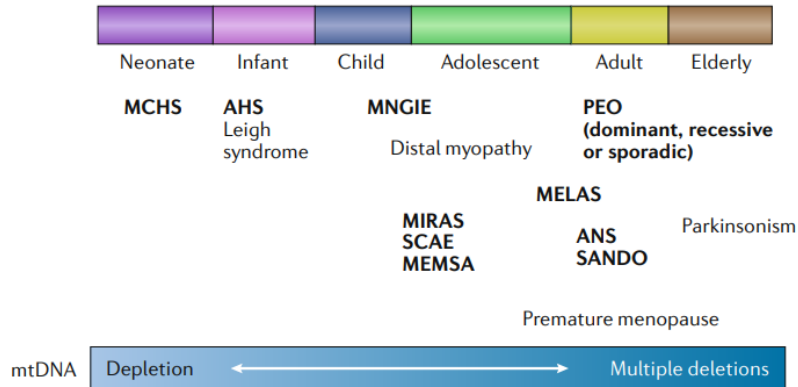


Ilustración 11. Espectro clínico de las enfermedades relacionadas con POLG en función de la edad de aparición y los defectos en el ADNmt asociados. Los nombres en negrita indican los síndromes más prevalentes. AHS, síndrome de Alpers-Huttenlocher; ANS, espectro de ataxia neuropática; MCHS, espectro infantil miocerebrohéptico; MELAS, encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios tipo ictus; MEMSA, ataxia sensorial con miopática epiléptica mioclónica; MNGIE, encefalopatía mitocondrial neurogastrointestinal; PEO, oftalmoplegia externa progresiva; SANDO, neuropatía atáxica sensorial, disartria y oftalmoplegia; SCAE, ataxia espinocerebelar con epilepsia (imagen de S. Rahman and W.C. Copeland, *Nat Rev*, 2019 [235]).

Se han descrito más de 300 mutaciones patogénicas de herencia dominante o recesiva en la POLG (<https://tools.niehs.nih.gov/polg/>), que pueden dar lugar o a depleción o a deleciones múltiples del ADNmt. No existe una relación clara entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes, que como ya hemos descrito anteriormente, pueden ser muy heterogéneos. Las mutaciones en *POLG* se pueden agrupar en 5 regiones diferentes, que han permitido generar un servicio de predicción de patogenicidad para ayudar en la predicción del diagnóstico clínico en base a las mutaciones que ya se conocen [236]. En cualquier caso, al igual que sucede con otros SDDM, la edad de aparición y progresión de las enfermedades relacionadas con POLG siguen siendo altamente impredecibles, sugiriendo que existen otros factores a parte de la mutación concreta, que modulan el fenotipo y que aún no conocemos. Estos factores podrían ser por ejemplo, modificadores genéticos del ADN nuclear o mitocondrial, el sistema inmune o factores medioambientales [237]. Tres variantes patogénicas autosómicas recesivas son responsables del 50% de los casos de deficiencias en POLG [238]. Estas variantes son cambios en los aminoácidos de la proteína: A467T, W748S (casi siempre en cis con el polimorfismo E1143G) y G848S. Todas estas mutaciones reducen la actividad catalítica de la pol γ , reduciendo la afinidad de la enzima por los dNTPs ó causando defectos en la unión al DNA. La variante Y955C es la mutación autosómica dominante más común en POLG y también reduce la actividad de la enzima. En la imagen (Ilustración 12) podemos ver todas las mutaciones que se han descrito hasta ahora en el gen de la POLG y la asociación con la enfermedad descrita.

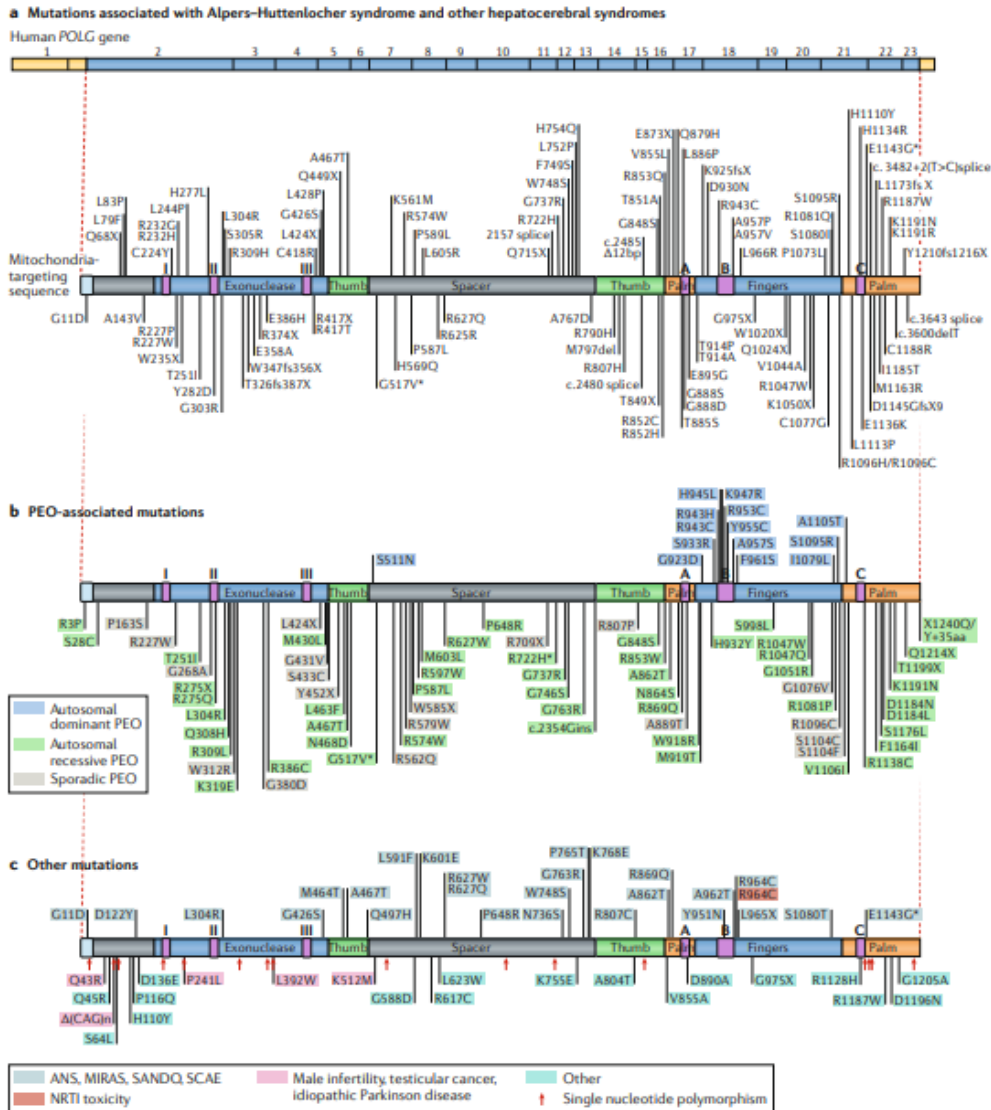


Ilustración 12. Mutaciones descritas en POLG y su asociación con las diferentes enfermedades. En cada panel podemos ver los 23 exones del cDNA y sus dominios funcionales. Los asteriscos indican las mutaciones que también han sido identificados como polimorfismos. A) Mutaciones asociadas al síndrome de Alpers-Huttenlocher y otros síndromes infantiles hepatocerebrales que cursan con depleción en el ADNmt. B) Mutaciones asociadas a oftalmoplejía progresiva externa (PEO). C) Otras mutaciones relacionadas con enfermedades asociadas a POLG. ANS, espectro de ataxia neuropática; MIRAS, síndrome mitocondrial recesivo de ataxia; NRTI, inhibidor de la nucleósido transcriptasa reversa; SANDO, neuropatía atáxica sensorial, disartria y oftalmoplegia; SCAE, ataxia espino cerebral con epilepsia (imagen de *S. Rahman and W.C. Copeland, Nat Rev, 2019 [235]*).

3.2.2. Estudios preclínicos en un modelo de fibroblastos de paciente deficientes en POLG

El modelo de deficiencia en POLG más estudiado es un KI con mutaciones que afectan a la actividad exonucleasa, y por tanto a la actividad correctora, del enzima. Este modelo presenta un fenotipo de envejecimiento prematuro con acumulación de mutaciones simples en el ADNmt [239, 240].

En cuanto a los modelos de estudio con la actividad polimerasa afectada, se intentó obtener un modelo KO para POLG que resultó ser letal alrededor de los 8 días después de la concepción,

demostrando que la presencia de POLG es esencial para el desarrollo embrionario [200]. El KO heterocigoto sí era viable, desarrollándose con normalidad pero conteniendo la mitad de número de transcritos de POLG y una reducción de los niveles de ADNmt [200].

Hay un modelo de ratón transgénico específico de corazón para la POLG con la mutación Y955C, la más común y grave con herencia autosómica dominante. Este modelo experimenta depleción del ADNmt en el corazón, que da lugar a cardiomiopatía e hipertrofia cardíaca [203]. La falta de disponibilidad de alguno de estos u otros modelos animales para trabajar con la deficiencia en POLG nos ha limitado a trabajar con modelos *in vitro* en este estudio.

A lo largo del tiempo, se han ido utilizando diferentes modelos celulares para el estudio de las deficiencias en POLG. Se empezó utilizando mioblastos o fibroblastos de pacientes diferenciados a miotubos, consiguiendo una depleción del ADNmt [183, 184]. La primera estrategia que se realizó *in vitro* en estos modelos se basaba en el uso de dAMP y dGMP, ampliándose su uso a los 4 dNMPs, con buenos resultados al restablecer parcialmente los niveles de ADNmt. Por otro lado, también se estableció como modelo *in vitro* la depleción del ADNmt forzada con BrEt en fibroblastos de pacientes con mutaciones en POLG [187]. En este caso las células se mantenían en crecimiento.

En este trabajo, se ha utilizado el modelo de depleción forzada del ADNmt en fibroblastos con mutaciones en distintos dominios funcionales de POLG, y un tratamiento basado en dNs para intentar recuperar la capacidad replicativa de estas células. .

Actualmente no existe ningún tratamiento para las enfermedades asociadas a POLG y las terapias sintomáticas son la base de los tratamientos, pero los resultados de este trabajo han dado pie a la licencia de una patente con objetivo de poder desarrollarlos: **TREATMENT OF MITOCHONDRIAL DISEASES** (depósito en la European Patent Office (EPO), *application number* EP15170825.2) incluido en el Anexo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los dNs actúan como precursores de la síntesis de dNTPs a través de la ruta de salvamento citosólica y mitocondrial. Estudios previos mostraron que el tratamiento de dThd y dCtd aumentaba la supervivencia y retrasaba la progresión de la enfermedad en un ratón *KI* portador de una mutación patogénica en la TK2. Nuestra hipótesis de trabajo sostiene que los dNs administrados utilizan la ruta de salvamento citosólica para la síntesis de dNTPs, por lo que también resultarán efectivos en un ratón *KO* para *Tk2* y, por tanto, carente de cualquier actividad del enzima. Esto apoyaría la idea de que cualquier paciente con deficiencia en TK2 podría beneficiarse de esta terapia independientemente de la mutación que presente en la enzima. Al igual que sucede con el ratón *KI* para *Tk2*, sostenemos que en el ratón *knock-out* la eficacia del tratamiento estará limitada a edades tempranas, y que son factores metabólicos y ontogénicos los que están condicionando el efecto terapéutico del tratamiento.

Por otro lado, la POLG forma parte de la maquinaria de replicación del ADN mitocondrial encargándose de su síntesis. Algunas mutaciones en este enzima pueden afectar a su afinidad por los dNTPs. Nosotros proponemos que aumentar la concentración de dNTPs mitocondriales mediante la administración de dNs, podría acelerar la actividad de polimerización de la POLG mutada favoreciendo la síntesis de ADNmt.

Objetivos

1. Testar la efectividad terapéutica del tratamiento con dThd y dCtd en un modelo de enfermedad carente de actividad TK2 (ratón *KO* para *Tk2*).
2. Estudiar factores metabólicos y ontogénicos que puedan estar modulando la efectividad del tratamiento con dThd y dCtd en la deficiencia en TK2.
3. Buscar estrategias terapéuticas alternativas o complementarias a la dThd y dCtd y que puedan mejorar o favorecer su eficacia en el tratamiento de la deficiencia en TK2.
4. Determinar si una terapia basada en la administración de dNs resulta eficaz para el tratamiento de defectos en el ADNmt causados por mutaciones en *POLG*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1. Técnicas generales de cultivo

1.1.1. Placas de cultivo utilizadas

En función del objetivo de cada experimento sembramos las células en placas de diferente diámetro y capacidad (Tabla 6).

Tabla 6: Tipos de placas de cultivo utilizadas

Nombre de la placa	Diámetro del pocillo	Superficie del pocillo	Cantidad de medio
P35	35 mm	8 cm ²	2 mL
P100	100 mm	58 cm ²	10 mL
P150	150 mm	152 cm ²	20 mL

1.1.2. Medios de cultivo utilizados

Utilizamos diferentes tipos de medio de cultivo en función del objetivo del experimento:

- **Medio completo:** Lo utilizamos para tener las células en constante crecimiento. Este medio está compuesto por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) *High-Glucose* (de elevada concentración de glucosa; 4,5 g/L), comúnmente utilizado para el crecimiento de células de mamífero. Lo suplementamos con un 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*, suero fetal bovino) rico en proteínas que proporcionan los factores de crecimiento necesarios y bajo nivel de anticuerpos. También añadimos L-Glutamina a una concentración de 2 mM (aminoácido esencial que sirve como fuente de energía para la propagación celular) y los antibióticos Penicilina-Estreptomicina 100 U/mL (como medida de seguridad para evitar contaminaciones por bacterias Gram+/-).
- **Medio de quiescencia:** Lo utilizamos para que las células entren en estado de quiescencia. Tiene la misma composición que el medio completo pero reducimos la concentración de FBS a un 0,1% y siendo éste dializado (utilizamos FBS dializado para reducir la presencia de desoxirribonucleósidos (dNs) y otros posibles interferentes con el experimento).
- **Medio de congelación:** Lo utilizamos para congelar las células y mantenerlas conservadas hasta su próximo uso en un congelador a -80 °C (durante periodos breves) o en nitrógeno líquido (durante periodos largos). El medio de congelación se compone de un 90% de FBS y un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; agente preservante de crioprotección).

1.1.3. Congelación de células de cultivos celulares

- Para congelar las células que tenemos en cultivo, primero aspiramos el medio y lavamos la placa con PBS (½ del volumen inicial de medio).
- Para despegar las células de la placa, añadimos tripsina 1X (1/10 del volumen inicial de medio) e incubamos a 37 °C hasta que las células se desprendan.
- Recogemos la suspensión de células en tripsina, con medio completo (5 veces el volumen de tripsina que hayamos añadido) y centrifugamos a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA).
- Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el *pellet* de células en 1 mL de medio de congelación por vial de criopreservación que queramos congelar (es recomendable congelar a 1/3 de confluencia de la placa).
- Guardamos los viales en un tanque de isopropanol en el congelador de -80 °C para asegurarnos una congelación lenta de las células y evitar así daños en las mismas.
- Pasamos los viales al tanque de nitrógeno a -170 °C transcurridas 24 horas para su mejor preservación.

1.1.4. Descongelación de células de cultivos celulares

- La descongelación de células a partir del congelador de -80 °C o del nitrógeno líquido, se tiene que realizar de forma rápida para evitar la toxicidad del agente criopreservador a las células.
- Pasamos los viales que queramos descongelar a un recipiente con hielo seco (-70 °C).
- Realizamos una descongelación rápida de las células en el baño a 37 °C.
- Resuspendemos el contenido del vial en 5 mL de medio completo.
- Centrifugamos a 400 g durante 5 minutos a TA.
- Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el *pellet* en el volumen de medio completo que queramos utilizar para sembrar.
- Sembramos la suspensión de medio y células a la/s placa/s donde queramos cultivarlas.

1.1.5. Dilución de densidad de células de cultivos celulares ó tripsinización

- Aspiramos el medio y lavamos la placa con PBS (½ del volumen inicial de medio).
- Para despegar las células de la placa, añadimos tripsina 1X (1/10 del volumen inicial de medio) y dejamos la placa en el incubador a 37 °C hasta que las células se despeguen.
- Recogemos la suspensión de células en tripsina, con medio completo (5 veces el volumen de tripsina que hayamos añadido) y centrifugamos a 400 g durante 5 minutos a TA.

- Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet de células en el volumen de medio completo que queramos sembrar las células.
- Sembramos la suspensión de medio y células a la/s placa/s donde queramos cultivarlas.

1.1.6. Recuento de células de cultivos celulares

- Seguimos el protocolo de dilución de densidad hasta tener las células en un *pellet*.
- resuspendemos las células en un volumen de medio completo conocido.
- Utilizamos una cámara de Neubauer para hacer el recuento celular en la suspensión.
- Cada portaobjetos tiene dos cámaras de recuento imprimadas en su superficie (Ilustración 13). Al cubrirlas con un cubreobjetos queda una ranura que permite llenar cada cámara por capilaridad. Pondremos 10 μL de la suspensión celular por cada una de las cámaras.
- Las retículas trazadas en cada cámara de recuento se dividen en 9 zonas cuadradas, de 1 mm de lado y 0,1 mm de alto cada una ($0,1 \text{ mm}^3$).
- Contamos las células que hay en las 4 zonas de las esquinas (cuadrados que a su vez se dividen en 4×4). Del recuento se obtiene un valor medio de las células que hay en cada $0,1 \text{ mm}^3$ (que equivaldrá a 10^{-4} ml).
- Entonces podemos calcular la concentración de células en suspensión como:

$$N \text{ células por zona}/10^{-4} \text{ mL} = N \times 10^4 \text{ células/ml de suspensión}$$

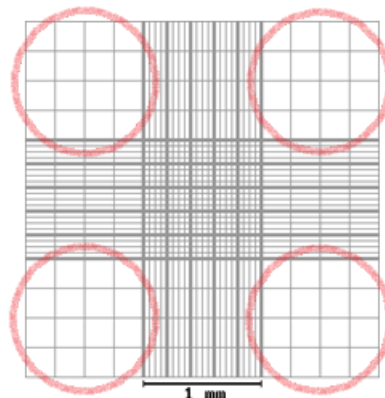


Ilustración 13: Cámara de Neubauer: Cada porta contiene dos cámaras reticuladas como ésta. Marcado con círculos rojos aparecen las 4 zonas 4×4 en las que contamos en número de células.

1.1.7. Preparación de células de cultivo para extracción de ADN

- Seguimos el protocolo de dilución de densidad hasta tener las células en un *pellet*.
- Lavamos el *pellet* con 1 mL de PBS.
- Centrifugamos a 400 g durante 5 minutos a TA.
- Aspiramos el sobrenadante y congelamos el pellet a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su próximo uso.

1.2. Obtención de fibroblastos a partir de una biopsia de piel

Para la obtención de fibroblastos a partir de biopsias de piel utilizamos este protocolo:

- La biopsia de piel nos llegará dentro de tubo lleno de medio de cultivo. Vertimos el contenido en una placa P100 y pasamos los trozos de piel a otra placa P100 con medio fresco. Cortamos los trozos de piel a un tamaño aproximado de 1 mm con bisturí y puntas estériles.
- Preparemos una mezcla de gelatina (al 1,5% y previamente atemperada a 37 °C) + plasma humano (1 mL de plasma + 2 mL de gelatina) y lo filtramos. Ponemos una gota en el centro de una placa de P35 y con una pipeta Pasteur (previamente modificada en forma triangular) lo extendemos por toda la placa. Preparar tantas placas como vayamos a utilizar, teniendo en cuenta que pondremos 5 trozos de biopsia por placa.
- Colocamos los trozos de piel en las placas P35 (unos 5 trozos por placa) y ponemos una gota de medio completo encima de cada trozo de biopsia. Dejamos secar en el incubador la placa durante 30 minutos para ayudar a que los trozos de biopsia queden enganchados en la placa. Sacamos la placa y añadimos medio completo hasta cubrirla.
- Dejamos crecer las células durante unos días cambiando el medio dos veces por semana. Cuando las células hayan crecido suficiente podemos volver a cultivar los explantes en otras placas nuevas. Las placas que quedan sin explante las dejamos crecer durante unos días más hasta que estén confluentes para hacer una dilución de densidad o congelación.

1.3. Células derivadas de pacientes con mutaciones en POLG

Hemos utilizado cultivos primarios de fibroblastos de piel de 5 pacientes con mutaciones en la subunidad catalítica de la polimerasa mitocondrial codificada por el gen *POLG* (NP_001119603.1; NM_001126131.1). Los pacientes presentan diferentes mutaciones y localización a lo largo de *POLG* (Tabla 7).

Paciente 1

El primer paciente era una mujer adulta y presentaba una mutación recesiva en homocigosis, p.[Arg309Cys];[Arg309Cys], c.[925C>T];[925C>T], localizada en el exón 4 de *POLG*. En cuanto a las características clínicas, su fenotipo era severo, con neuropatía periférica (PN), oftalmoplegia externa progresiva (PEO), ataxia y encefalomiopatía (parecida a la que se da en la encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE)). Otros de sus síntomas incluían disartria-distrofia, epilepsia, pérdida de la audición, retinosis pigmentaria e ictus. También

padecía pseudo-obstrucción intestinal crónica (CIPO), una enfermedad rara causada por dismotilidad intestinal y asociada a deficiencia mitocondrial [241]. El paciente tenía familiares con historial de afectación similar y padres consanguíneos, y murió a los 22 años en estado epiléptico. En la bibliografía es el único caso descrito con esta mutación, siendo el Arg309 un amino ácido muy conservado [107].

Paciente 2

El segundo paciente era un adulto que presentaba 2 mutaciones recesivas en heterozigosis, p.[Trp748Ser];[Gly848Ser], c.[2243G>C];[2542G>A], en los exones 13 y 16 respectivamente (rs113994097 y rs113994098). Su fenotipo era menos severo pero similar al del primer paciente. Presentaba síndrome de Alpers-Huttenlocher (AHS) con neuropatía, disfunción hepática transitoria, encefalopatía progresiva con ataxia, síntomas psiquiátricos y sintomatología gastrointestinal. Murió alrededor de los 25 años tras cometer suicidio. La mutación p.[Trp748Ser] es una mutación muy común asociada a fenotipos muy graves de la enfermedad. En ocasiones la clínica asociada puede estar modulada por polimorfismos en POLG [242] que hacen que sea menos deletérea. La mutación p.[Gly848Ser] afecta a un residuo muy conservado y suele manifestarse en patrones de herencia recesivos [107].

Paciente 3

El tercer paciente presentaba dos mutaciones en heterozigosis. Por un lado tenía un polimorfismo con rol modulador frente a la presencia de otras mutaciones en *POLG*, p.[Glu1143Gly] (rs2307441), que disminuye la actividad catalítica de la enzima [109]. Esta mutación puede modificar la expresión de las mutaciones que le acompañan y recuperar parcialmente los efectos dañinos de éstas afectando tanto a su unión a la cadena de ADN como a su actividad [109]. Por otro lado tenía otra mutación dominante en cis, p.[Val1177Leu], de la que no hay referencias bibliográficas aún siendo éste el primer caso descrito. Las dos mutaciones están localizadas en los exones 21 y 22 respectivamente (p.[Glu1143Gly;Val1177Leu], c.[3428A>G;3529G>C]). Las características clínicas del paciente eran adPEO, intolerancia al ejercicio con debilidad muscular proximal de aparición tardía y problemas psiquiátricos.

Los pacientes 1, 2 y 3 presentaban acumulación de deleciones múltiples en músculo. Las células de estos tres pacientes fueron proporcionadas por la Dra. Anne Lombès (Insitut Cochin, INSERM Paris).

Paciente 4

La cuarta paciente tenía dos mutaciones recesivas en heterocigosis, p.[Leu623Trp];[Lys755Glu], c.[1868T>G];[c.2263A>G] en los exones 10 y 13 respectivamente. Presentaba enfermedad hepática con aparición neonatal y tenía un hermano gemelo que murió siendo portador de las mismas mutaciones pero con un fenotipo más severo y una depleción marcada del ADNmt [243]. Estas células fueron proporcionadas por la Dra. Irene Bruno (IRCCS Burlo Garafolo, Trieste).

Paciente 5

La quinta paciente era una mujer de 50 años con una mutación simple en heterocigosis p.[Tyr955Cys], c.[2864A>G]; rs113994099, localizada en el exón 18, de herencia autosómica dominante. La paciente había desarrollado a lo largo de su cuarta década una ptosis palpebral bilateral y oftalmoparesis externa incompleta, asociada a fatiga muscular muy intensa, falta de resistencia física y mialgias ante esfuerzos leves. No presentaba debilidad muscular establecida en la exploración neurológica. Los análisis de *southern blot* del ADNmt mostraban acumulación de deleciones múltiples. Estas células fueron proporcionadas por la Dra. Cristina Domínguez-González y el Dr. Miguel Ángel Martín (Unidad de enfermedades neuromusculares, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid).

Utilizamos fibroblastos de donantes sanos como controles. Tanto las células de los pacientes como las de los controles sanos se obtuvieron con el consentimiento informado de los pacientes y en base a la Declaración de Helsinki.

Tabla 7: Lista de pacientes con mutaciones en POLG

Paciente	Variante en POLG	Sustitución de amino ácido en POLG	Patrón de herencia	Dominio de POLG
P1	c.[925C>T];[925C>T]	p.[Arg309Cys];[Arg309Cys]	Autosómico recesivo	Exonucleasa
P2	c.[2243G>C];[2542G>A]	p.[Trp748Ser];[Gly848Ser]	Autosómico recesivo	Linker / Polimerasa
P3	c.[3428A>G;3529G>C]	p.[Glu1143Gly;Val1177Leu]	Autosómico dominante	Polimerasa
P4	c.[1868T>G];[c.2263A>G]	p.[Leu623Trp];[Lys755Glu]	Autosómico recesivo	Linker
P5	c.[2864A>G]	p.[Tyr955Cys]	Autosómico dominante	Polimerasa

1.4. Diseño experimental para el análisis de la recuperación del número de copias de ADNmt en fibroblastos primarios

Los fibroblastos de controles sanos y pacientes los crecemos primeramente en medio completo hasta alcanzar el volumen de células requerido para el experimento. Las condiciones de incubación utilizadas son siempre de 37 °C y de una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Una vez obtenemos la cantidad celular suficiente de cada una de las líneas, sembramos los fibroblastos en placas de P35, con una confluencia de 120.000 células por placa y utilizando el mismo medio de cultivo anteriormente descrito. Plaqueamos duplicados para cada condición experimental y lo mantenemos en las mismas condiciones hasta que alcanzamos el 100% de confluencia. Entonces inducimos el estado de quiescencia de los fibroblastos durante 3 días con medio de quiescencia.

Una vez las células están en quiescencia, recogemos el punto del Día 0 e iniciamos el tratamiento con 25 mg/mL de Bromuro de Etidio (BrEt) durante 10 días para forzar la depleción del ADN mitocondrial (ADNmt) de las células. A Día 10 volvemos a recoger las células y comenzamos con la fase de recuperación del ADNmt. Retiramos el BrEt del medio de cultivo y administramos el tratamiento de desoxirribonucleósidos (dNs). Manteniendo el medio de quiescencia, lo suplementamos con 50 µM de cada uno de los dNs (dAdo (desoxirriboadenosina), dThd (desoxirribotimidina), dCtd (desoxirribocitidina) y dGuo (desoxirriboguanosina)) solos o en combinación con 5 µM de EHNA (eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina), inhibidor de la adenosina desaminasa (ADA), principal responsable de la degradación de dAdo. El tratamiento lo llevamos a cabo durante 20 días adicionales y recogemos las muestras en los Días 20 y 28/30.

Realizamos controles para todas las líneas donde no se suplementa el medio con dNs ni EHNA (Ilustración 14). Durante los tratamientos, cambiamos el medio cada 3-4 días y todos los tratamientos los realizamos por duplicado. Los *pellets* de células de cada uno de los puntos los recogemos por tripsinización y los almacenados a -20 °C hasta su posterior procesamiento. El medio de cultivo también lo recogemos en función del diseño experimental y almacenamos a -20 °C.

Los experimentos iniciales los realizamos con mayores concentraciones de dNs (200 µM). Decidimos reducir la concentración de dNs a 50 µM en los siguientes experimentos tras comprobar su estabilidad en el cultivo celular. Tras la retirada del BrEt, el ADNmt comienza a recuperarse hasta alcanzar los niveles previos a la depleción forzada. Los días que tarda en alcanzar este número de copias iniciales es variable y para asegurarnos que esto ocurre

decidimos expandir la fase de recuperación del experimento de los 10 días iniciales a los 18/20 actuales. Después de varias semanas en quiescencia, los fibroblastos presentan signos de estrés, por lo que decidimos no recoger células a partir de este día (un máximo de 30). Esta observación también nos lleva a acortar la duración de la exposición del BrEt (de 14 a 10 días) y aumentar su concentración (de 5 a 25 ng/mL) para asegurarnos la depleción del ADNmt. Por estas razones, hay pequeñas modificaciones en las condiciones experimentales que están especificadas en cada uno de los casos incluidos en esta tesis.



Ilustración 14: Esquema del diseño experimental utilizado

1.5. Extracción del ADN de muestras de células de cultivo

El ADN total lo extraemos de los *pellets* de células recogidos y guardados a -20 °C. Para ello utilizamos el QiAmpDNA Minikit (Quiagen) siguiendo el protocolo específico para células en cultivo. Eluimos el ADN en una solución de Tris-HCl a 10 mM (pH 8) y cuantificamos por espectrofotometría haciendo una lectura de absorbancia a 260 nm (NadoDrop Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific).

Además de conocer la concentración de ADN de la muestra, podemos saber la pureza de la misma con la relación de absorbancias entre 260 nm y 280 nm (donde absorben las proteínas u otros compuestos residuales del proceso de extracción). Este ratio 260 nm/280 nm tiene que ser de alrededor de 1,8.

Hasta su próximo uso, guardamos en ADN extraído en el congelador a -20 °C. Este ADN aislado lo utilizaremos tanto para la detección de deleciones múltiples del ADNmt, como para la cuantificación del número de copias del ADNmt.

1.6. Detección de deleciones múltiples del ADNmt por PCR larga

Para comprobar si existen o no deleciones en el ADNmt en los fibroblastos de las muestras de pacientes y controles recogidas con anterioridad, realizamos una PCR larga que amplifica todo el ADNmt. Utilizamos las muestras a Día 0 (justo antes de empezar el tratamiento con BrEt para forzar la depleción) y Día 28/30 (en la fase de recuperación con o sin el tratamiento).

Partiendo del ADN anteriormente aislado de las muestras, realizamos una PCR larga diseñada para amplificar casi todo el ADNmt (16,3kb), usando un *primer forward* correspondiente a la secuencia de la cadena L (nt-1482-1516) y un *primer reverse* para la cadena H (nt-1180-1146) y el kit comercial Takara LA Taq (Takara), optimizado para amplificaciones largas [244].

Realizamos la mezcla de la reacción (Tabla 8) e incubamos en el termociclador con el programa correspondiente (Tabla 9).

Tabla 8: Mezcla de reacción para amplificar el ADNmt

Reactivo (concentración origen)	Concentración final	Volumen
LA PCR Buffer II (10X)	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	2,5 µL
dNTP Mixture (2,5 mM)	400 µM	4 µL
Primer Forward (2 µM)	200 nM	2,5 µL
Primer Reverse (2 µM)	200 nM	2,5 µL
TaKaRa LA Taq (5 U/µl)	0,05 U/µl	0,25 µL
DNA Molde (75 ng/µL)	3 ng/µL	1 µL
H ₂ O	hasta un V _{final} de 25 µL	9,75 µL

Tabla 9: Condiciones de reacción para amplificar el ADNmt

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	1'	1
98 °C	10''	30
68 °C	11'	
72 °C	10'	
4 °C	∞	

Resolvemos los productos de PCR por electroforesis en un gel de agarosa para fragmentos grandes al 0,8% (peso/volumen) en buffer de TBE (Tris-borato-EDTA, Alfa Aesar). Añadimos BrEt (0,6 g/mL de TBE) que se intercala en el ADN mientras éste se desplaza a lo largo del gel de agarosa y así permitirnos visualizarlo después al exponerlo a una fuente ultravioleta. Cada producto de PCR (5 µL) lo cargaremos con 2 µL de tampón de carga Orange G (Sigma Aldrich) y utilizaremos el marcador de peso molecular λ DNA HindIII (Thermo Fisher Scientific) y controles de ADN de músculo de donantes sanos y pacientes diagnosticados con deleciones en el ADNmt,

como controles negativos y positivos, respectivamente. Corremos el gel durante 60-120 minutos a 100 V y visualizamos las bandas en un transiluminador.

1.7. Secuenciación del ADNmt

La secuenciación del ADNmt ha sido realizada por Lidia Carreño Gago y la metodología está incluida en su tesis “Configuración de una estrategia para la identificación genético-molecular de pacientes con enfermedad mitocondrial” dentro del departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) en el año 2017. También está brevemente explicado en el Artículo II incluido en el apartado de resultados 2.

2. Experimentación Animal

2.1. Condiciones de estabulación

Llevamos a cabo el estudio con un modelo de ratón *knock-out* para la *TK2* (*TK2^{KO}*) con *background* genético de C57BL/6. Este modelo ha sido previamente generado y caracterizado [204]. Los ratones los hemos estabulado y crecido en un ambiente estándar controlado bajo ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con un acceso a agua y comida ilimitada. El modelo de ratón *TK2^{KO}* desarrolla una encefalomiopatía fatal y muere alrededor de las dos semanas de vida. Nosotros hemos monitorizado el peso corporal, el comportamiento, apariencia general y supervivencia diariamente. Por razones éticas, hemos eutanasiado a los ratones en los estudios de supervivencia, cuando eran demasiado débiles como para moverse y obtener la comida y bebida necesarias.

2.2. Farmacocinéticas

Para conocer la biodisponibilidad de la dThd y la dCtd, realizamos farmacocinéticas en ratones tanto adultos como crías. La administración del tratamiento la realizamos por la vía oral, intravenosa (IV) o intraperitoneal (IP). Recogemos una muestra de sangre antes de administrar el tratamiento (tiempo 0) y después de administrarlo a diferentes tiempos. La recogida y procesamiento de la sangre para la obtención del plasma están descritos en el apartado de material y métodos 2.5.1.

2.3. Tratamientos administrados a los ratones

Durante el transcurso de este trabajo hemos administrado diferentes tratamientos a los ratones por vía oral (Tabla 10). El máximo volumen administrable por *gavage* a los ratones es de 10 $\mu\text{L/g}$.

Tabla 10: Tratamiento utilizados para administrar a los ratones

Tratamiento	Dosis	Vehículo	Tiempo de administración
dThd+dCtd	400 mg/kg/día	PBS	Desde día 4 postnatal hasta su muerte
dTMP+dCMP	620 mg/kg/día	PBS	Desde día 4 postnatal hasta su muerte
dThd	400 mg/kg/día	PBS	Desde día 4 postnatal hasta su muerte
dCtd	400 mg/kg/día	PBS	Desde día 4 postnatal hasta su muerte
dThd+dCtd	400 mg/kg/día	PBS	Desde día 4 postnatal hasta día 16 postnatal
Orotato	400 mg/kg/día	H ₂ O	Desde día 4 postnatal hasta su muerte
dThd+dCtd	400 mg/kg/día	PBS	Desde día 4 postnatal hasta su muerte
Orotato*	50 mg/kg/día	H ₂ O	Desde día 21 postnatal hasta su muerte

*En este caso el orotato en vez administrarse por *gavage*, se administraba mediante el biberón que contiene cada jaula.

2.4. Diseño experimental

Cada uno de los tratamientos lo administramos diariamente con una sola dosis de *gavage* oral que comienza a los 4 días postnatal. Las soluciones de dThd, dCtd, dTMP y dCMP las preparamos en PBS, esterilizamos por filtración y guardamos a 4 °C (o -20 °C para almacenamiento a largo plazo) hasta su administración a los ratones *TK2^{KO}* y sus hermanos wild-type, *TK2^{WT}*. La dThd y la dCtd las administramos tanto en combinación como de forma individualizada, todos ellos a una dosis de 400 mg/kg/día (165mM de dThd y 176mM de dCtd). La dTMP y la dCMP las co-administramos a una dosis equimolar de 620mg/kg/día. El orotato lo administramos a 400 mg/kg/día por *gavage* o a 50 mg/kg/día disuelto en el agua del biberón de la jaula a una dosis de 50 mg/kg/día. Administramos un grupo de animales control con una solución de PBS como vehículo.

Los ratones los sacrificamos a los días 12 o 29 postnatal (excepto aquellos que están incluidos en las curvas de supervivencia) una hora después de la administración del tratamiento (coincidiendo con la biodisponibilidad máxima del tratamiento administrado en sangre, tal y como hemos realizado en nuestros estudios farmacocinéticos previos (apartado de resultados 1.1). El estado de salud de los ratones *TK2^{KO}* tratados degenera gradualmente, mostrando los primeros signos de debilidad pocos días antes de la muerte (apartado de resultados 1.2). Por ello, para prevenir la deshidratación y malnutrición de los ratones a edades tempranas de la enfermedad, proporcionamos a todas las camadas accesibilidad a comida semi-sólida desde el día 15 después del nacimiento.

2.5. Sacrificio y extracción de muestras

2.5.1. Plasma

Para obtener plasma de los ratones, utilizamos o sangre circulante periférica (en ratones de 12 días) o sangre proveniente de punción cardiaca (para ratones de 29 días). La sangre la recogemos en capilares recubiertos con EDTA (Microvette capillary tubes, SARSTEDT) y la mantenemos en hielo antes de procesarla a 3.500 g a 4 °C por 5 minutos para obtener el plasma. Las muestras las guardamos a -20 °C hasta su próximo uso.

2.5.2. Órganos

Los tejidos (cerebro, hígado, músculo esquelético (gastrocnemio) e intestino delgado) los recogemos e inmediatamente congelamos en nitrógeno líquido y guardamos a -80 °C hasta su próximo uso. El lumen del intestino delgado lo limpiamos con abundante solución salina antes de congelarlo en nitrógeno líquido.

2.6. Extracción de ADN de muestras de ratón

2.6.1. Con fines de genotipado

Para el genotipado de los ratones TK2 utilizamos extremos de cola de un par de milímetros (extraídos *post-mortem*) o perforaciones de orejas (que también servirán para identificar los animales). Podemos proceder con la extracción de ADN directamente ó guardar las muestras en el congelador si nuestra intención es hacerlo otro día. Con este protocolo obtenemos de forma rápida una cantidad suficiente de ADN para poder hacer el genotipado de los ratones.

Tabla 11: Mezcla de reacción para el buffer de lisis

Reactivo (concentración origen)	Concentración final	Volumen
Tris-HCl (1 M)	50 mM	25 mL
NaCl (5 M)	100 mM	10 mL
EDTA (0,5 M)	2,5 mM	2,5 mL
SDS 20%	0,5% (peso/volumen)	12,5 mL
H ₂ O	hasta un V _{final} de 500 mL	

- Añadimos 400 µL de buffer de lisis (Tabla 11) suplementado con proteinasa K 0,2 mg/mL a la muestra de oreja/cola
- Lo incubamos a 55 °C durante 5-12 horas
- Añadimos 75 µl de acetato potásico 8 M y vorteamos
- Añadimos 500 µl de cloroformo y vorteamos (realizarlo en campana)
- Centrifugamos a 13.000 g durante 10 minutos a TA

- Transferimos la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 mL
- Añadimos 2 volúmenes de etanol absoluto
- Centrifugamos a 13.000 g durante 20 minutos a TA
- Eliminamos el sobrenadante y limpiamos el *pellet* blanquinoso que habrá quedado con 1 mL de etanol al 75%
- Centrifugamos a 13.000 g durante 10 minutos a TA
- Eliminamos el sobrenadante y dejamos secar el *pellet* blanquinoso a TA o en un termo bloque a 55 °C
- Resuspendemos el *pellet* en 50 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8. Para facilitar la solubilización del ADN podemos incubarlo a 55 °C durante unos minutos
- Guardamos el ADN a 4 °C hasta su próximo uso

2.6.2. Con fines de realizar estudios bioquímicos

El DNA total lo extraeremos de los tejidos previamente congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80 °C. Para hacer la extracción previamente tendremos que pulverizar los órganos con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, garantizando que la muestra permanezca congelada durante el proceso. Pulverizar todo el órgano nos ayudará a homogenizar las muestras y asegurarnos que los resultados que obtengamos a partir de la misma sean representativos de todo el órgano. Utilizaremos una cucharadita de polvo (50 mg aproximadamente) para extraer el ADN con el QiAmpDNA Minikit (Qiagen) siguiendo el protocolo específico para tejidos. Es importante no exceder la capacidad de la columna. Eluimos el ADN en una solución de Tris-HCl a 10 mM (pH 8) y cuantificamos por espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm (NadoDrop Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). Hasta su próximo uso, guardamos el ADN extraído en el frigorífico a -20 °C. Este ADN aislado lo utilizaremos para la detección de depleción del ADNmt.

2.7. Genotipado de ratones

Una vez tenemos el ADN procedente de tejido de ratón aislado, pasamos a realizar la reacción de PCR para genotipar a los ratones. Utilizamos una estrategia en la que mediante una sola reacción de PCR podemos amplificar una banda para el alelo *WT* y otra banda para el alelo *KO*. Para la generación de este ratón, se sustituyó el exón 4 y parte del 5 por un casete de resistencia a neomicina. Para genotipar utilizamos un mismo *primer reverse* para los alelos *WT* y *KO*, y *primers forward* diferentes para cada alelo. En el caso de la amplificación del alelo *WT*, el *primer forward* estará situado en una región que ha sido eliminada en el ratón *KO*. En el caso de la amplificación del alelo *KO* el *primer forward* estará situado en la región del casete de neomicina

que ha quedado tras la generación del modelo de ratón. Así el esquema del genotipado es el siguiente (Ilustración 15), y los *primers* los que se enseñan abajo:

- *Primer TK2Neo Fw* GCCAGCTCATTCTCCCACTC
- *Primer TK2WT Fw* TACCATGATGCCAGCCGATG
- *Primer TK2WT Rv* CCTGTGAGGACAGGAGACCT

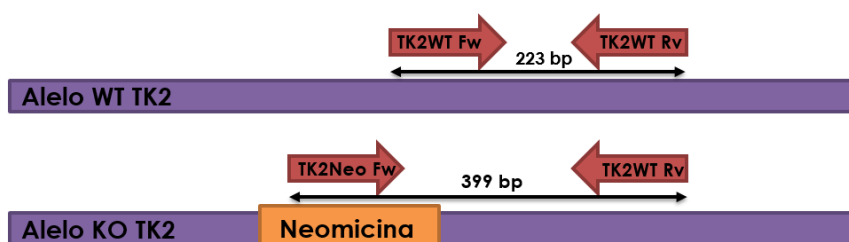


Ilustración 15: Esquema del diseño de primers para la genotipación.

En la amplificación del alelo *WT* se genera una banda de 223 bp mientras que en la del alelo *KO* se genera una banda de 399 bp.

Realizamos la mezcla de la reacción utilizando el kit comercial TaKaRa Taq HS PCR kit UNG plus y ponemos el termociclador con el programa correspondiente (Tablas 12 y 13).

Tabla 12: Mezcla de reacción para genotipar

Reactivo (concentración origen)	Concentración final	Volumen
PCR Buffer for UNG plus (10 X)	1 X	2 µL
dU plus dNTP Mixture (12,5 X)	1 X	1,6 µL
<i>Primer TK2WT Forward</i> (10 µM)	0,5 µM	1 µL
<i>Primer TK2Neo Forward</i> (10 µM)	0,5 µM	1 µL
<i>Primer TK2WT Reverse</i> (10 µM)	0,5 µM	1 µL
TaKaRa Taq HS (5 U/µl)	0,025 U/µL	0,1 µL
UNG (2 U/µL)	0,02 U/µL	0,2 µl
ADN Molde	50-200 ng	2 µL
H ₂ O	hasta un V _{final} de 20 µL	

Tabla 13: Condiciones de reacción para genotipar

Temperatura	Tiempo	Ciclos
25 °C	10'	1
95 °C	2'	1
95 °C	30''	30
60 °C	30''	
72 °C	30''	
72 °C	10'	1
4 °C	∞	

El producto de PCR lo resolvemos en un gel de agarosa que contenga BrEt para que se vaya intercalando en el ADN que vaya corriendo y así poder visualizarlo después en el transiluminador.

El gel de agarosa para fragmentos pequeños lo prepararemos al 2% (peso/volumen) con Buffer TBE. Disolveremos la agarosa en el microondas y antes de poner a polimerizar el gel, añadimos BrEt 0,6 g/mL de TBE.

Una vez el gel haya polimerizado, cargamos los productos de PCR en la misma. De los productos de PCR correremos 5 μ L. Utilizamos un marcador de peso molecular de 1 kb, del que ponemos 1 μ l mezclado con 4 μ l de H₂O. A todas las muestras les añadimos 2 μ L de tampón de carga, Orange G (Sigma-Aldrich) que ayudaran no solo a visualizar las muestras, sino a que precipiten en los pocillos.

Corremos el gel durante 20 minutos a un voltaje de 100 V. Una vez el gel haya corrido, visualizamos las bandas con la ayuda de una transiluminador UV.

3. PCR cuantitativa a tiempo real

3.1. Cuantificación del número de copias de mtDNA por RT-PCR

Real-Time PCR para el estudio de depleción

Con la técnica de Real-Time podemos determinar el número de copias de un gen mitocondrial y un gen nuclear de copia única en una reacción con sondas y *primers* específicos para la amplificación de estos genes. Las sondas utilizadas son de tipo TaqMan con fluorocromos que emiten luz a una determina longitud de onda (FAM y VIC) que podemos leer y registrar de forma independiente. El ratio gen mitocondrial/gen nuclear nos permitirá determinar si existe una depleción, es decir, una disminución del número de copias de ADNmt/genoma nuclear haploide.

El número de copias de las muestras la calculamos por extrapolación de curvas de calibración preparadas con unos estándares de los cuales conocemos el número de copias. Los estándares tienen plásmidos en los cuales hay clonado el fragmento del gen mitocondrial y nuclear respectivamente. Los genes mitocondriales y nucleares que utilizamos varían en función del origen de las muestras.

Muestras de DNA a procesar

Una vez extraído el DNA de cada una de las muestras, realizamos diluciones 1/3 con Tris 10 mM pH 8 y ponemos por duplicado tanto las muestras originales de ADN como las diluciones 1/3 en

la placa de RT-PCR. La dilución de las muestras nos servirá para acotar mejor la muestra dentro de la curva estándar y para apreciar la presencia de posibles interferentes con la reacción de amplificación.

Preparación de la placa

Añadimos 7,5 µL de mezcla de reacción en cada uno de los pocillos de reacción y finalmente los 2,5 µL de ADN correspondiente en cada caso. Sellamos la placa con una lámina adhesiva y hacemos un *spin* en la centrífuga antes de procesarla en el termociclador. La PCR real-time cuantitativa se realiza en un termociclador y detector de fluorescencia ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) (Tabla 14). A los 60 °C de cada ciclo de amplificación se realiza la lectura de fluorescencia, que será proporcional a la cantidad de producto de reacción en cada uno de los ciclos.

Tabla 14: Condiciones de reacción para la RT-PCR

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50 °C	2'	1
95 °C	10''	1
95 °C	15''	40
60 °C	1'	

Análisis de los datos

El análisis de los datos lo realizamos con el programa SDS 2.4 (Applied Biosystems), primeramente establecemos las concentraciones de los estándares que sirven también como control interno de placa, para posteriormente poder cuantificar el resto de muestras.

Condiciones para la determinación en muestras humanas

Para el estudio de depleción en muestras humanas utilizamos el gen mitocondrial 12S rRNA y el gen nuclear de copia única RNAsaP. En este caso la reacción de Real-Time que llevaremos a cabo es multiplex. Cada una de las sondas utilizadas tiene un flouocromo diferente (FAM, en el caso de 12Sr RNA y VIC en el caso de RNAsaP) que emite luz a diferente longitud de onda y permitiendo por tanto la lectura simultánea de ambas sondas.

Primers, sondas y ensayos comerciales

Para cuantificar la RNAsaP *utilizamos* un ensayo comercial, RNAsaP Control Reagent (Fluoróforo VIC-Quencher TAMRA; Applied Biosystems) que incluye los *primers y sonda necesarios para su amplificación*. Para la cuantificación del 12S rRNA utilizamos los primers y sonda por separado:

- 12S rRNA *Primer Fw*: 5'- CCA CGG GAA ACA GCA GTG AT -3' (ntd 805-824*)
- 12S rRNA *Primer Rv*: 5'- CTA TTG ACT TGG GTT AAT CGT GTG A -3' (ntd 903-927*)

- 12S rRNA Sonda: FAM - 5'- TGC CAG CCA CCG CG -3'- MGB (ntd 888-900*)

*posición de los *primers* según la secuencia de referencia del ADNmt humano NC_012920.

Dilución de trabajo de los estándares

Preparamos las diluciones a partir del estándar (STD) madre con Tris 10 mM pH 8 que contienen copias conocidas de los genes RNAsa P y 12S rRNA (Tabla 15). Cada punto de los STD así como el control los determinaremos por triplicado.

Tabla 6: Curva de estándares utilizados

	Nº copias/5µL 12S rRNA	Nº copias/5µL RNAsa P
STD1	9000000	90000
STD2 (STD1 diluido 1/3)	3000000	30000
STD3 (STD2 diluido 1/3)	1000000	10000
STD4 (STD3 diluido 1/3)	333333	3333
STD5 (STD4 diluido 1/3)	111111	1111
Control Tris 10 mM pH 8	0	0

Mezcla de reacción

En esta reacción multiplex (los reactivos para la amplificación de ambos genes (12S rRNA y RNAsa P) se añaden en el mismo pozo) añadimos 7,5 µL de mezcla de reacción a cada pozo de la placa. Las reacciones de Real-Time PCR cuantitativa las realizamos en placas de 384 pocillos y utilizamos la Master Mix Universal de PCR de TaqMan con UNG (TaqMan® Universal Master Mix II, with UNG (Uracil-N-Glycosylase), Applied Biosystems) (Tabla 16).

Tabla 7: Mezcla de reacción para cuantificación de ADNn y ADNmt en muestras humanas

Reactivo (concentración de origen)	Concentración final	Volumen
Master Mix (2X)	1X	5 µL
Primer Fw 12S (4 µM)	100 nM	0,25 µL
Primer Rv 12S (4 µM)	100 nM	0,25 µL
Sonda mit 12S (5 µM)	125 nM	0,25 µL
Assay RNAsa P (20X)	1X	0,5 µL
H ₂ O	Hasta V _{final} de 7,5 µl	1,25 µL

Condiciones para la determinación en muestras de ratón

En las muestras de ratón utilizamos el gen mitocondrial 16S (localizado en una zona conservada fuera de las moléculas con delección simple) y el gen nuclear de copia única angiogenina 1 (ANG1).

Primers, sondas y ensayos comerciales

Para cuantificar la ANG1 utilizamos un ensayo comercial (ANG1 Inventoried Assay Life Technologies: Mm00833184_s1), mientras que para cuantificar las copias de gen 16S rRNA utilizamos *primers* y sondas separados [245].

- 16S rRNA *Primer Fw*: 5' AAT GGT TCG TTT GTT CAA CGA TT 3'
- 16S rRNA *Primer Rv*: 5' AGA AAC CGA CCT GGA TTG CTC 3'
- 16S rRNA Sonda: FAM-5' AAG TCC TAC GTG ATC TGA GTT 3'-MGB

Diluciones de los estandars

Utilizamos dos curvas de estandars con los amplicones Ang1 (Tabla 17) y 16S rRNA (Tabla 18) clonados para hacer la cuantificación absoluta de la mtDNA y nDNA. Preparamos las diluciones con Tris 10 mM pH 8. Ponemos cada uno de los STD por triplicado en cada placa.

Tabla 8: Curva de estándares utilizados

	ANG1	Nº copias/ μ L
STD1		108.000
STD2 (STD 1 dil 1/6)	5 μ L STD1 +25 μ L Tris	18.000
STD3 (STD 2 dil 1/6)	5 μ L STD2 +25 μ L Tris	3.000
STD4 (STD 3 dil 1/6)	5 μ L STD3 +25 μ L Tris	500
STD5 (STD 4 dil 1/2)	9 μ L STD4 +9 μ L Tris	250

Tabla 18: Curva de estándares utilizados

	16S	Nº copias/ μ L
STD1	No se pone en la placa	11.070.000
STD2 (STD 1 dil 1/3)	9 μ L STD1 +18 μ L Tris	3.690.000
STD3 (STD 2 dil 1/3)	9 μ L STD2 +18 μ L Tris	1.230.000
STD4 (STD 3 dil 1/3)	9 μ L STD3 +18 μ L Tris	410.000
STD5 (STD 4 dil 1/3)	9 μ L STD4 +18 μ L Tris	136.670
STD6 (STD 5 dil 1/3)	9 μ L STD5 +18 μ L Tris	45.555

Mix de reacción

Preparamos una mix diferente para cada ensayo utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix II, with UNG (Applied Biosystems). Utilizamos placas de 384 pocillos donde el volumen total es de 10 μ L (Tablas 19 y 20).

Tabla 19: Mezcal de reacción para cuantificación de ADNn en muestras de ratón

Reactivo (concentración de origen)	Concentración final	Volumen
Master mix (2X)	1X	5 μ L
Assay ANG1	<i>Primers</i> 900 nM, sonda 250 nM	0,5 μ L
H ₂ O	Hasta V _{final} de 10 μ L	2 μ L
ADN	20-50 ng	2,5 μ L

Tabla 20: Mezcla de reacción para cuantificación de ADNmt en muestras de ratón

Reactivo (concentración de origen)	Concentración final	Volumen
Master mix (2X)	1X	5 μ L
Primer 16S Forward (10 μ M)	300 nM	0,3 μ L
Primer 16S Reverse (10 μ M)	300 nM	0,3 μ L
Sonda 16S (5 μ M)	150 nM	0,3 μ L
H ₂ O	Hasta V _{final} de 10 μ L	1,6 μ L
ADN	20-50 ng	2,5 μ L

3.2. Expresión de enzimas en muestras de ratón

Para determinar la expresión de diferentes enzimas que queremos estudiar, cuantificamos el número de copias de cDNA de los diferentes genes en los diferentes tejidos. Primeramente extraemos el RNA total de los tejidos, hacemos una retro-transcripción de este RNA a cDNA, y finalmente mediante una real-time PCR cuantificamos el número de copias de cada gen.

Extracción de RNA de órganos de ratones

Para extraer el RNA total de los tejidos de ratón, primero de todo pulverizamos los órganos con nitrógeno líquido y mortero. De una cucharadita de polvo de órgano (aproximadamente 50 mg) extraemos el RNA siguiendo el protocolo de TRIzol™ Reagent (Invitrogen) y cuantificamos su concentración con el espectrofotómetro NanoDrop.

Tratamos con DNAsa I el RNA extraído con el Kit Ambion DNAsa-free para eliminar restos de DNA genómico contaminante. Diluimos 5 μ g de RNA en un V_{final} de 20,5 μ L para tratarlos con DNAsa I (diluimos con H₂O RNAsa-free) (Tabla 21).

Tabla 21: Mezcla de reacción para el tratamiento con DNAsa I

Reactivo	Volumen
10X DNAsa I buffer	2,5 μ L
rDNAsal	2 μ L
RNA 5 μ g	20,5 μ L (ó 21)
V _{final}	25 μ L

- Incubamos la reacción a 37 °C durante 30 minutos.
- Añadimos 2,5 μ L del inhibidor para DNAsa I que contiene el kit.
- Dejamos 2-5 minutos a TA.
- Centrifugamos 2 minutos a 10.000 g para eliminar el inhibidor sobrante.
- Guardamos el sobrenadante a -20 °C hasta su próximo uso.

Al final de la reacción tendremos 0,2 µg/µL (5 µg en 25 µL) RNA tratado con DNAsa. Para evaluar la calidad del RNA obtenido, podemos analizar 2 µL del producto tratado con DNAsa en el Bioanalyzer (Nano XP, entre 25-500 ng/µL) ó correr un 1 µL de producto en un gel de agarosa al 2% (peso/volumen). La relación entre las bandas correspondientes a los rRNA, y tRNA que por su abundancia podemos visualizar directamente en gel con un agente intercalante como el BrEt, nos da una idea de la calidad del RNA analizado. El Bioanalyzer utiliza un sistema de electroforesis capilar y agentes intercalantes fluorescentes para evaluar de igual modo la relación entre rRNA, tRNA y un estándar de calidad interno.

Reacción RT-PCR para obtención de cDNA

Realizamos la transcripción reversa del RNA a cDNA utilizando el High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) (Tablas 22 y 23).

Tabla 22: Mezcla de reacción para la retro-transcripción

Reactivo (concentración de origen)	Concentracion finales	Volumen
10X RT buffer	2X	4 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	2X	1,6 µL
10X RT <i>Random primers</i>	2X	4 µL
MultScribe <i>Reverse Transcriptase</i> (50 U/µL)	5 U/µL	2 µL
Nuclease-free wáter	Hasta V_{final} 40 µL	8,4 µL
RNA DNase treated	0,125 µg/µL	20 µL

Tabla 23: Condiciones de reacción para la retro-transcripción

Temperatura	Tiempo	Ciclos
25 °C	10'	1
37 °C	120'	1
85 °C	85'	1
4 °C	∞	

Reacción RT-PCR para expresión

Realizamos la reacción real-time PCR cuantitativa utilizando placas de 384 pocillos y la TaqMan Universal PCR Master Mix II, with UNG (Applied Biosystems) (Tabla 24). Utilizamos los ensayos TaqMan de expresión génica prediseñados (Applied Biosystems) para la detección de los niveles de mRNA de los diferentes genes que queremos estudiar. Además utilizamos el gen de la ciclofilina A (PPIA) como referencia para normalizar los valores entre las diferentes muestras:

- Timidina fosforilasa (*Tymp*): Mm01301808_m1
- Citidina deaminasa (*Cda*): Mm01341706_m1

- Timidina quinasa 1 (*Tk1*): Mm01246403_g1
- Deoxicitidina quinasa (*Dck*): Mm00432794_m1
- Ciclofilina A (*Ppia*) Mm02342430_g1

Cada muestra la analizamos por triplicado y el valor medio se utiliza como medida de mRNA que se normalizará con los niveles de mRNA del PPIA que tomaremos como referencia. Las muestras de cDNA estan a 2 µg/10 µL y la diluimos a 1 µg/20 µL (1/4).

Tabla 24: Mezcla de reacción para expresión

Reactivo (concentración de origen)	Concentración final	Volumen
Master Mix (2X)	1X	5 µL
Sonda específica para cada gen (20X)	1X	0,5 µL
H ₂ O	Hasta V _{final} de 10 µL	2 µL
cDNA molde (1 µg/20 µL)	0,0125 µg/µL	2,5 µL

4. Ensayos Bioquímicos

4.1. Determinación de dNTPs totales en cultivos celulares

Crecimiento y tratamiento de las células

Para hacer la cuantificación de los dNTPs celulares totales, crecemos los fibroblastos en placas de 150 mm de diámetro para cada condición hasta que llegan a la confluencia. Después de inducir la quiescencia durante 9 días, suplementamos el medio celular con dNs (50 µM de cada) únicamente o junto con EHNA (5 µM) durante 5 días adicionales (haciendo un cambio de medio una vez entre medias).

Recogida de células y extracción de dNTPs

En una cámara fría, lavamos cada placa dos veces con PBS frío y rascamos las células con una rasqueta y un 1 mL de PBS. Recogemos todo el producto en un tubo de 1,5 mL y lo centrifugamos a 450 g durante 5 minutos a 4 °C para obtener un *pellet* de células. El *pellet* lo tratamos con 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 0,5 M y centrifugamos durante 5 minutos a 20.000 g a 4 °C. Recogemos los sobrenadantes y los neutralizamos añadiendo 1,5 volúmenes de trietilamina (TOA) 0,5 M en freon (1,1,2-triclorotrifluoroetano). Vorteamos bien y centrifugamos durante 10 minutos a 10.000 g a 4 °C. Recogemos solo 400 µL de la fase acuosa para prevenir contaminaciones de la fase orgánica. Los extractos de las fases acuosas neutralizadas los secamos en una cámara de vacío y los guardamos a -80 °C hasta su análisis.

Determinación enzimática de dNTPs

Para realizar la determinación de dNTPs en los extractos, utilizamos un método basado en la reacción de extensión catalizada por el enzima polimerasa [48]. Determinamos cada uno de los nucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) por separado con reacciones independientes. Los principales elementos necesarios para esta reacción enzimática son los que se describen a continuación.

Oligonucleótidos

El método utiliza pequeños polímeros que se forman tras la hibridación de dos cadenas de nucleótidos: una cadena corta y otra más larga y específica para cada uno de los dNTPs que queramos medir. La secuencia corta es común en todos los casos y funciona como *primer*. La secuencia larga se une al *primer* y tendrá una secuencia conocida y diferente en función del dNTP que vayamos a determinar. En todos los casos, la cadena larga contiene el nucleótido complementario al que queremos determinar (que se unirán a los nucleótidos presentes en la muestra durante la polimerización), espaciado por múltiplos de timina que se hibridarán con el radionucleótido (dATP-³H) que utilizamos en la cuantificación. En el caso de la determinación de dATP, el radionucleótido es dTTP-³H y la secuencia contiene múltiplos de adenina (Tabla 25).

Tabla 25: Secuencias de los oligonucleótidos para la determinación de dNTPs

dNTP a determinar	Tipo de oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido
dATP	Cadena larga Cadena corta	5' AAATAAATAAATAAATAATGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
dTTP	Cadena larga Cadena corta	5' TTATTATTATTATTATTAGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
dCTP	Cadena larga Cadena corta	5' TTTGTTTGTGTTTGTGTTTGGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'
dGTP	Cadena larga Cadena corta	5' TTTCTTTCTTCTTTCTTTCGGCGGTGGAGGCGG 3' 3' CCGCCACCTCCGCC 5'

Cada una de las cadenas que componen el oligonucleótido se sintetiza por separado (Invitrogen) y posteriormente realizamos una hibridación de las mismas. Para ello resuspendemos los productos liofilizados en NaCl 0,1 M, llevándolos a una concentración final de 100 µM cada uno. Preparamos diluciones equimolares de cada una de las cadenas y mezclamos cada cadena corta con la cadena larga. Introducimos el tubo con la mezcla de las dos cadenas en un baño a 70 °C y dejamos que la temperatura baje hasta llegar a TA lentamente. De esta manera obtenemos los oligonucleótidos hibridados a una concentración final de 50 µM. Realizamos diluciones a 5 µM con agua y congelamos las alícuotas a -20 °C hasta su próximo uso.

dNTPs radioactivos

Utilizamos diferentes radionucleótidos para la determinación de los diferentes dNTPs. Para la determinación de dTTP, dCTP y dGTP utilizamos el 3H-dATP, mientras que para la determinación de dATP utilizamos el 3H-dTTP (Moraveck). Los radionucleótidos los recibimos disueltos en etanol 50% que tendremos que eliminar para poder llevar a cabo la reacción. Tras calcular el volumen de radionucleótido que necesitamos para cada determinación, lo pasamos a un tubo de 1,5 mL y evaporamos en una centrifuga *speed-vac* a temperatura ambiente. El sedimento seco que quede lo resuspendemos en agua a la concentración deseada.

Polimerasa

La enzima con actividad polimerasa que utilizamos para llevar a cabo la reacción es la Sequencing Taq DNA Polymerase (Bioron). Durante la reacción, la polimerasa utiliza la cadena corta del oligonucleótido como *primer*, y la cadena larga como molde para incorporar tanto los nucleótidos procedentes de las muestras, como el nucleótido radioactivo. La reacción de extensión se realiza durante 1 hora a 48 °C y es a punto final. La determinación del nucleótido radioactivo que se haya incorporado al oligonucleótido, es la señal radioactiva que obtendremos posteriormente, y dependerá de la cantidad de cada dNTP que haya en la muestra que queramos medir.

Se realiza una curva patrón para poder determinar la concentración de cada uno de los dNTPs que haya en la muestra. La curva patrón la incluimos en la determinación específica de cada dNTP (con cada pareja de oligonucleótidos) y la realizamos a partir de diluciones seriadas que contienen una concentración conocida de los cuatro dNTPs. Las diluciones las realizamos en Tris-HCl 40 mM pH 7,4 y son las que se especifican a continuación:

- Para el dATP, dCTP y dGTP: 400 nM, 200 nM, 100 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM.
- Para el dTTP: 100 nM, 70 nM, 40 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM.

Para preparar la reacción, trabajamos en todo momento en hielo. Los extractos de dNTPs totales de las células, los resuspendemos en un volumen determinado de Tris-HCl 40 mM pH 7,4 y realizamos una dilución 1/3 en el mismo buffer de cada muestra donde también determinamos las concentraciones de dNTPs. Realizamos cada determinación de cada muestra por cuatriplicado (por duplicado cada una de las diluciones) y por triplicado cada una de las diluciones de la curva patrón. La reacción contiene 5 µL de cada una de las muestras que queramos medir y otros 5 µL de mezcla de reacción (Tabla 26).

Tabla 26: Mezcla de reacción para la determinación de dNTPs

Reactivo (concentración de origen)	Concentración final	Volumen
Tris-HCl pH 7,4 (1M)	20 mM	0,2 μ L
MgCl ₂ (0,1 M)	10 mM	1 μ L
DTT (0,5 M)	5 mM	0,1 μ L
Oligonucleótido (5 μ M)	0,25 μ M	0,5 μ L
Radionucleótido (15 μ M)	0,75 μ M	0,5 μ L
Sequencing Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L)	0,025 U/ μ L	0,05 μ L
H ₂ O	Hasta V _{final} de 5 μ L	2,65 μ L
Muestra problema		5 μ L

Una vez preparadas las reacciones, mezclamos con un vortex y centrifugamos mediante un *spin* antes de incubarlas a 48 °C durante 1 hora en un baño. Una vez transcurrido este tiempo, paramos la reacción colocando las muestras en hielo otra vez. Realizamos un *spin* y colocamos 9 μ L del producto de la reacción en unos filtros de dietilaminoetilo (DEAE) (Filtermat, PerkinElmer). Dejamos secar al aire o con una lámpara de infrarrojos. El filtro permite la unión específica del ADN que habrá incorporado parte del radionucleótido. Mediante lavados a pH ácido podemos eliminar los restos de radionucleótido libre que hayan podido quedar adheridos al filtro. Para ello posteriormente realizamos los siguientes lavados seriados en agitación:

- 3 lavados de 10 minutos con 5% (peso/volumen) de fosfato de sodio monobásico hidrato (Na₂HPO₄) a pH 5
- 3 lavados de 5 minutos con 5% (peso/volumen) de Na₂HPO₄ a pH 5
- 1 lavado de 10 minutos con agua destilada
- 1 lavado de 10 minutos con etanol 70% (volumen/volumen)

Volvemos a secar los filtros al aire o con una lámpara de infrarrojos. Después de secar los filtros, añadimos 2 mL de líquido de centelleo Ultima Gold (Perkin Elmer) para cada una de las reacciones y detectamos la radioactividad incorporada en un contador beta TriCarb (Perkin Elmer). Calculamos la concentración de cada dNTP en las muestras por interpolación de los resultados de las curvas patrón utilizadas para cada dNTP. También tendremos en cuenta las diluciones realizadas a lo largo del procedimiento para poder corregirlo. Determinamos la concentración en al menos 2 cultivos independientes por cada una de las condiciones y líneas celulares.

4.2. Determinación de dNs en medios de cultivo

Los dNs añadidos en el medio de cultivo, así como los metabolitos formados por la degradación de los mismo, son cuantificados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

en tándem (LC-MS/MS), utilizando el aparato Acquity UPLC-MS/MS (Acquity UPLC-Xevo™ TQ Mass Spectrometer, Waters, Mildred, MA, USA). Los medios de cultivo de los fibroblastos de los diferentes pacientes y controles, los recogemos 48 horas después del último cambio de medio. Guardamos medios que habían sido suplementados con el tratamiento de dNs con EHNA y sin EHNA, y a modo de control, medios sin tratamiento donde no esperamos encontrar valores detectables de dNs (ya que usamos suero dializado con este fin).

Deproteinización de las muestras de medio de cultivo por ultrafiltración

Preparamos el medio de cultivo para poder analizarlo por el sistema LC-MS/MS. Para ello desproteinizamos las muestras con unas columnas de ultrafiltración de 3 kDa (Amicon Ultra Filters, MilliporeSigma) que previamente preparamos.

- Filtramos 300 µL de H₂O milliQ en cada columna a 14.000 g durante 5 minutos a 4 °C.
- Eliminamos el filtrado, invertimos el filtro y centrifugamos a 1.000 g durante 1 minuto a 4 °C.
- Añadimos la muestra al filtro
- Centrifugamos a 14.000 g 30 minutos a 4 °C
- Recuperamos el filtrado y descartamos el filtro y contenido residual
- Realizamos diluciones 1/10 de cada una de las muestras filtradas con PBS
- Congelamos las muestras a -20 °C hasta su próximo uso

Utilizamos una curva multi-estandar que contenga los compuestos que queramos cuantificar en la muestra y con concentraciones conocidas que nos permitan realizar la detección y cuantificación de los mismos. Cargamos las muestras y el multi-estándar en placas de 96 pocillos (Waters® 1ml Round Collection Plate) para inyectarlos en el sistema LC/MS-MS.

4.3. Determinación de dNs en muestras de ratón

Determinamos la dThd, dCtd y sus productos de degradación (timina (Thy) y deoxiuridina (dUrd)) en plasma y muestras de tejido por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), usando un sistema LC-MS/MS ((Acquity UPLC-Xevo™ TQ Mass Spectrometer, Waters, Milford, MA, USA).

Preparación de las muestras de tejido

Tendremos los tejidos congelados a -80 °C. Pulverizamos los tejidos con ayuda de nitrógeno líquido y un mortero, evitando que se descongelen. Para cada muestra utilizamos una cucharada de polvo de órgano que homogenizamos en hielo con piezas de plástico y 250 µL de buffer de

lisis (Tabla 27 y 28). La dThd* (dThd deuterada (Cambridge Isotope Laboratories)) la utilizamos como estandar interno para corregir cualquier degradación o alteración de la dThd natural durante el procesamiento de las muestras.

Tabla 27: Receta del Buffer de lisis

Reactivo	Concentración del reactivo	Concentración en la solución
PMSF (fluoruro de penilmetilsulfonil)	100 mM	1:50 (2 mM)
Thd*	100 μ M	1:100 (1 μ M)
THU (tetrahidouridina)	40 mM	1:400 (100 μ M)
6-amino-5-bromouracilo	5 mM	1:50 (100 μ M)
Tampón de lisis		Hasta V_{final}

Tabla 28: Receta Tampón de lisis

Reactivo	Concentración en la solución
Tritón X-100	1%
2-mercaptoetanol	0,02%
Tris-HCl (pH 7,2)	50 mM
H ₂ O	Hasta V_{final}

- Tras la homogenización, centrifugamos los homogenados a 20.000 g durante 30 minutos a 4 °C y recogemos los sobrenadantes.
- Medimos la concentración de proteína con el método Bradford. Para ello generamos una muestra final que estará compuesta por una solución A y una solución B, donde la solución problema quedará diluida 20 veces.
 - o Solución A: Diluimos la muestra con H₂O 1:10 (90 μ L H₂O milliQ + 10 μ L muestra)
 - o Solución B: Diluimos el buffer de lisis con H₂O 1:10 (90 μ L H₂O milliQ + 10 μ L buffer lisis)
 - o Muestra final: 45 μ L de solución A y 45 μ L de solución B
- Medimos la proteína de 5 μ L de la muestra final que reaccionarán con 250 μ L de Bradford. Utilizaremos una curva patrón para poder cuantificar la proteína de las muestras problema.
 - o Curva de proteína (Tabla 29):

Tabla 29: Curva de proteína

[proteína]	BSA 2 mg/mL	Buffer de lisis 1/10 (B)	H ₂ O
1 mg/mL	100 µl	20 µl	80 µl
0,5 mg/mL	100 µl (del 1)	10 µl	90 µl
0,25 mg/mL	100 µl (del 0,5)	10 µl	90 µl
0,125 mg/mL	100 µl (del 0,25)	10 µl	90 µl
0,0625 mg/mL	100 µl (del 0,125)	10 µl	90 µl
0 mg/mL	-	20 µl	180 µl

Deproteinización de las muestras de tejido y plasma por ultrafiltración

Preparamos los extractos de tejido y plasma para poder ser analizados por el sistema LC-MS/MS. Para ello desproteinizamos las muestras con unas columnas de ultrafiltración de 10 kDa (Amicon Ultra Filters, MilliporeSigma) que preparamos como hemos indicado previamente en el apartado de material y métodos 4.2.

Utilizamos una curva multi-estandar que contenga los compuestos que queramos cuantificar en la muestra, y con concentraciones conocidas que nos permitan realizar la detección y cuantificación de los mismos. Las muestras y el multi-estándar las cargamos en placas de 96 pocillos (Waters® 1ml Round Collection Plate) para ser inyectados en el sistema LC/MS-MS. En el caso de las muestras de tejido, los estandars estarán resuspendidos en la misma matriz que las muestras, el tampón de lisis. Además los suplementaremos con 1 µM de dThd*.

Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Para todas las determinaciones de dNs y sus metabolitos, la fase estacionaria es una columna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 130 Å pore, 1,7 mm particle, Waters). Para las determinaciones inyectamos 7,5 µL de las muestras deproteinizadas en el sistema LC-MS/MS y las resolvemos a 0,5 mL/minuto por mediación de un gradiente de elución binario, usando un tampón salino (20 mM de acetato de amonio, pH 5,6) y acetonitrilo como se determina a continuación:

- Tiempo 0-1,1 minutos, tampón salino 100% isocrático
- Tiempo 1,1-5 minutos, gradiente de 0 a 13,6% de acetonitrilo
- Tiempo 5-5,1 minutos, gradiente de 13,6 a 100% de acetonitrilo
- Tiempo 5,1-6,1 minutos, 100% de acetonitrilo isocrático
- Tiempo 6,1- 7,2 minutos, tampón salino 100% isocrático

Realizamos la detección de los componentes de elución usando una reacción de monitorización múltiple, con un modo de *electrospray* positivo con las siguientes transiciones de *m/z*:

- 251,8 > 136,1 dAdo
- 242,8 > 127,1 dThd
- 267,9 > 152,1 dGuo
- 228,8 > 113,1 dUrd
- 227,9 > 112,1 dCtd
- 136,8 > 110,1 hipoxantina
- 136,8 > 110,1 dIno
- 151.7 > 110.1 guanina
- 126.7 > 110.0 timina
- 255.0 > 133.8 dThd* (deuterada)

La identificación de los metabolitos con misma transición m/z se basa en sus diferentes tiempos de retención. Las curvas de calibración realizadas con estándares acuosos las procesamos en paralelo y las concentraciones las obtenemos por la integración de las áreas de los picos utilizando el software TargetLynx (Waters).

4.4. Actividad TP y CDA en muestras de ratón

El protocolo para la determinación de la actividad catalítica de la timidina fosforilasa (TP) y la citidina deaminasa (CDA) es una adaptación de Martí et al. [246].

Preparación de las reacciones

Preparamos 8 tubos de 1,5 mL por cada muestra que vayamos a analizar:

1. Muestra de tejido lisado
2. Dilución 1/10 con H₂O (90 µl de H₂O y 10 µl de muestra 1)
3. Dilución 1/100 con buffer de lisis 1/10 (90 µl de buffer de lisis 1/10 y 10 µl muestra 2)
4. 1,35 mg de proteína (en un V_{final} de 400 µl con H₂O)
5. Actividad TP (TA)
6. Actividad TP blanco (TB)
7. Actividad CDA (CA)
8. Actividad CDA blanco (CB)

Homogenado de las muestras

Los tejidos los tendremos congelados a -80 °C. Pulverizamos los tejidos con ayuda de nitrógeno líquido y un mortero, evitando que se descongelen. Para cada muestra utilizamos una cucharada de polvo de órgano que homogenizamos en hielo con piezas de plástico y 500 µL de tampón de lisis (Tabla 30). El PMSF lo añadimos justo antes de utilizar el tampón.

Tabla 30: Receta del Tampón de lisis

Reactivo	Concentración en la solución
PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)	1:50 (2 mM)
Tritón X-100	1%
2-mercaptoetanol	0,02%
Tris-HCl (pH 7,2)	50 mM
H ₂ O	Hasta V _{final}

- Centrifugamos los homogenados a 20.000 g durante 30 minutos y a 4 °C. Veremos que precipita la fracción celular (tubo 1).
- Recogemos el sobrenadante y realizamos dos diluciones secuenciales 1/10 (tubo 2) y 1/100 (tubo 3) de las muestras.
- Realizamos la determinación de proteína con el método Bradford sobre las muestras (tubo 3) (8 µl de muestra y 200 µl de azul comassie (Protein Reagent, Bio-Rad)).

Ensayo de actividad

- Llevamos todas las muestras a una concentración de 1,35 mg/mL (tubo 4).
- Para llevar a cabo la reacción, incubamos 100 µg de proteína con 10 mM de dThd en un volumen final de buffer de reacción de 100 µL (0,1 M Tris-arsenato, pH 6,5) para la actividad TP (tubo 5, TA) o con 5 mM de dCtd en un volumen final de tampón de reacción de 100 µL (0,2 M Tris-HCl, pH 8; 100 µM 6-amino-5-bromouracilo [6A5BrU]) para la actividad CDA (tubo 7, CA). La 6A5BrU nos ayudará a inhibir la actividad TP (Tablas 31 y 32)
- Realizamos un blanco en el que se omite la adición de dThd (tubo 6, TB) y dCtd (tubo 8, CB).

Tabla 31: Mezcla de reacción para la actividad TP

Reactivo (concentración de origen)	Concentración final	Volumen en Reacción (TA)	Volumen en Blanco (TB)
Buffer de reacción: tris-arsenato 0,5 M pH 6,5	0,1 M	20 µL	20 µL
Muestra (1,35 mg/mL)	100 ug	74 µL	74 µL
dThd (166 mM)	10 mM	6 µL	-
V _{final}		100 µL	94 µL

Tabla 10: Mezcla de reacción para la actividad CDA

Reactivo (concentración de origen)	Concentración final	Volumen en Reacción (TA)	Volumen en Blanco (TB)
Tampón de reacción: 1M Tris-HCl pH 8	0,2 M	18 µL	18 µL
6A5BrU (5mM)	100 µM	2 µL	2 µL
Muestra (1,35 mg/mL)	100 µg	74 µL	74 µL
dCtd (83,33 mM)	5 mM	6 µL	-
V _{final}		100 µL	94 µL

- Incubamos la reacción a 37 °C durante 1 hora.
- Paramos la reacción añadiendo 1 mL de HClO₄ 0,55 M (desnaturaliza las proteínas, parando la reacción).
- Al blanco le añadimos 10 mM de dCtd o dThd.
- Vorteamos y centrifugamos a 20.000 g durante 10 minutos a 20.000 g y 4 °C para precipitar proteínas.
- Guardamos los sobrenadantes en el congelador a -20 °C para su próximo uso.

Cromatografía líquida (UPLC)

Para todas las determinaciones de dNs y sus metabolitos, la fase estacionaria es una columna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 130 Å pore, 1,7 mm particle, Waters). Para las determinaciones inyectamos 5 µL de las muestras deproteinizadas en el sistema Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) y las resolvemos a 0,5 mL/minuto por mediación de un gradiente de elución binario, usando un buffer salino (20 mM de acetato de amonio, pH 5,6) y un eluyente orgánico (metanol) como se determina a continuación:

- Tiempo 0-1,1 minutos, buffer salino 100% isocrático
- Tiempo 1,1-5 minutos, gradiente de 0 a 13,6% de metanol
- Tiempo 5-5,1 minutos, gradiente de 13,6 a 100% de metanol
- Tiempo 5,1-6,1 minutos, 100% de metanol isocrático
- Tiempo 6,1- 7,2 minutos, buffer salino 100% isocrático

Monitorizamos la absorvancia de los eluidos a 267 nm y los picos de la Thy (producto de la reacción de la TP) o la dUrd (producto de la reacción de la CDA) los identificamos y cuantificamos usando una curva de calibración multiestandar.

4.5. Actividad TK1 y dCK en muestras de ratón

La puesta a punto y medida de las actividades TK1 y dCK está incluida en el trabajo final de master de Daniel Jiménez Heis, con el título “Estudi de les activitats TK1 i dCK durant el

desenvolupament murí: relació amb l'efectivitat del tractament del dèficit de TK2 amb nucleòsids" realizado dentro del Máster de Biotecnología Avanzada de la UAB en el curso 2018/2019. La metodología está brevemente explicado en el Artículo I incluido en el apartado de resultados 1.2.

5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos los hemos realizado con el software de GraphPad Prism 6. Los test específicos usados en cada caso estarán indicados en la leyenda de cada gráfica. Para facilitar el análisis estadístico, los valores indetectables los hemos considerado cero.

RESULTADOS

Los resultados de esta tesis están divididos en dos bloques, en el primero se describen los estudios preclínicos *in vivo* para el tratamiento con dNs con un modelo murino de deficiencia en TK2. El segundo bloque incluye los experimentos *in vitro* realizados con fibroblastos primarios humanos, para testar la posible aplicación del tratamiento a la deficiencia en POLG. La tesis además se ha realizado por compendio de publicaciones por lo que incluye dos artículos que son el núcleo principal de este trabajo, además de otros resultados que complementan la investigación.

El bloque 1 está dividido en cinco partes. El punto 1.1 incluye los estudios farmacocinéticos preliminares realizados con dThd y dCtd en ratones de distinta edad. El punto 1.2 corresponde al Artículo I con el estudio preclínico detallado en ratones deficientes en TK2. En el punto 1.3 se profundiza en el estudio de la posible interacción entre dThd y dCtd tras su co-administración. Finalmente, en los puntos 1.4 y 1.5 exploran variantes del diseño experimental con interrupción temprana del tratamiento y activación suplementaria de rutas alternativas de la síntesis de nucleótidos, respectivamente. El bloque 2 corresponde al Artículo II con el estudio de la administración de dNs en fibroblastos de pacientes con mutaciones en la POLG.

- Bloque 1: Estudio preclínico sobre el tratamiento con dNs en un modelo murino de deficiencia en TK2
 - 1.1 Estudio farmacocinético preliminar de los dNs en ratones
 - 1.2 Artículo I: Los cambios metabólicos debidos a la edad limitan la eficacia de la terapia basada en desoxirribonucleosidos en un ratón deficiente en TK2
 - 1.3 Estudio sobre la competencia de los dNs por la entrada al torrente sanguíneo
 - 1.4 Estudio de supervivencia con interrupción del tratamiento
 - 1.5 Estudio de la estimulación de la ruta de síntesis *de novo* de los dNTPs
- Bloque 2: Artículo II: El incremento del *pool* de dNTPs recupera la depleción del ADNmt en fibroblastos de humanos deficientes en POLG

1. Estudio preclínico sobre el tratamiento con dNs en un modelo murino de deficiencia en TK2

1.1. Estudio farmacocinético preliminar de la dThd y dCtd en ratones

Introducción

En el presente trabajo de tesis doctoral, testamos la eficacia de los dNs pirimidínicos, dThd y dCtd, como tratamiento para la deficiencia en TK2, en el modelo de ratón *knock-out* (KO) para este enzima [204] (apartado de resultados 1.2). Dado que los ratones deficientes en TK2 mueren prematuramente entre la segunda y tercera semana de vida [204, 205], era importante administrar el tratamiento lo antes posible. En nuestro caso administramos el tratamiento diariamente desde día 4 postnatal [229]. El reducido tamaño de las crías y el carácter crónico del tratamiento limitaron las opciones de vía de administración a la oral (*gavage*).

Para seleccionar una vía de administración a utilizar en el estudio preclínico, primeramente realizamos un breve estudio farmacocinético comparando diferentes vías de administración en ratones *WT* tanto adultos como crías. Además, el comportamiento farmacocinético de la dThd y la dCtd en el organismo afecta a las determinaciones de su concentración en tejidos y otros parámetros de estudio en este trabajo. Este estudio farmacocinético ayuda a determinar el momento idóneo para la recogida de muestras tras la administración de dThd y dCtd durante el estudio preclínico posterior (apartado de resultados 1.2).

Material y Métodos

Para ello administramos la máxima dosis posible de tratamiento (500 mg/kg de dThd y dCtd) teniendo en cuenta la solubilidad de los compuestos en el vehículo acuoso (50 mg/ml en PBS) y el volumen máximo administrable por *gavage* (10 μ L/g). Para observar la biodisponibilidad de la dThd y la dCtd, recogimos diferentes muestras de sangre, antes de administrar el tratamiento (minuto 0) y después de la administración a diferentes tiempos. La recogida y análisis de las muestras de plasma están descritas en el apartado de material y métodos 2.5.1. Para facilitar la interpretación de los resultados se ha utilizado la representación de la media y el error estándar de la media (SEM) en las gráficas de este apartado.

Resultados y Discusión

Farmacocinéticas en ratones adultos

Para estudiar la biodisponibilidad de la dThd y la dCtd en el plasma de ratones adultos, comparamos tres vías de administración diferentes: oral, intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV). Una vez administrado el tratamiento, fuimos recogiendo muestras de sangre a diferentes

tiempos durante 8 horas. Posteriormente extrajimos el plasma y cuantificamos tanto la dThd y la dCtd, como sus primeros productos de degradación, la Thy y la dUrd.

Los resultados muestran que se alcanzan concentraciones más altas tanto de dThd como de dCtd con la administración IV, seguida de la IP, y concentraciones mucho más bajas con la administración oral. Los picos donde se concentran los niveles más altos de ambos compuestos son diferentes en función de la vía de administración también. Por vía oral el pico de mayor concentración lo encontramos entre los 60-90 minutos después de administrar el tratamiento, por vía IP entre los 15-30 minutos y por vía IV a los 5 minutos (Ilustración 16).

Durante las 8 horas monitorizamos la biodisponibilidad de la dThd y la dCtd en plasma. Vemos cómo una vez alcanzado el pico de concentración máxima, los niveles de ambos compuestos descienden hasta llegar a los que había en el minuto 0 antes de la administración del tratamiento, correspondiéndose con los niveles basales. En cuanto a los primeros productos de degradación de la dThd y la dCtd (la Thy y la dUrd, respectivamente), podemos ver que sus picos de biodisponibilidad coinciden o se alcanzan justo después del pico de concentración máxima de sus precursores, especialmente en las vías IP y IV (Ilustración 16).

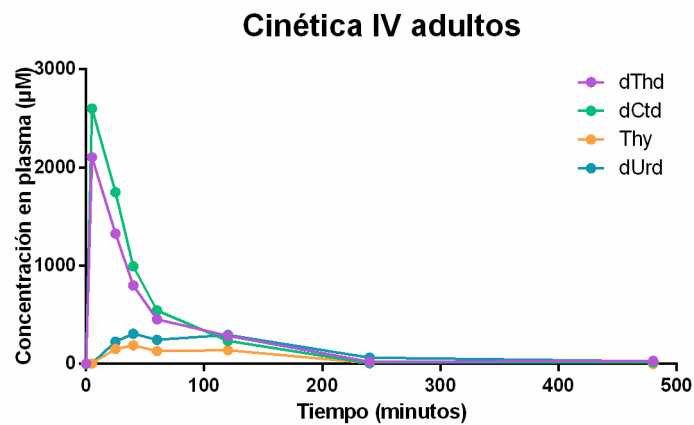
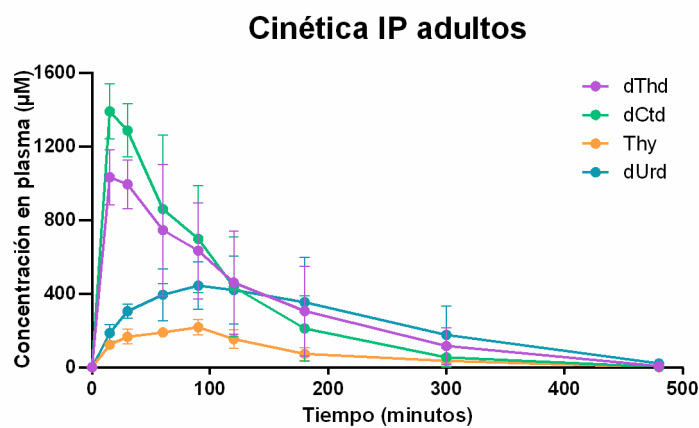
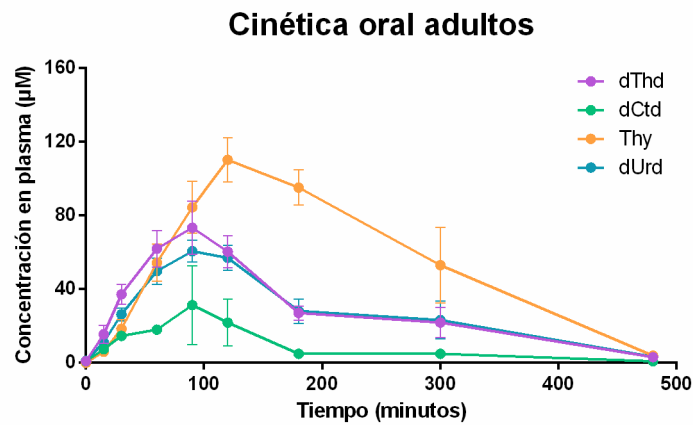


Ilustración 16. Cinéticas de dThd y dCtd (y sus productos de degradación) en plasma de ratones adultos tras su administración por vía oral, IP o IV. Concentraciones en μM de dThd y dCtd así como sus primeros productos de degradación (Thy y dUrd respectivamente) en plasma. Cinéticas realizadas en ratones adultos WT ($n=4$ en la cinética oral e IP y $n=1$ en la cinética IV) tratados con 500 mg/kg de dThd y dCtd. Muestras recogidas a los minutos 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 300 y 480 en la cinética oral e IP y a los minutos 0, 5, 25, 40, 60, 120, 240 y 480 en la cinética IV. Los puntos indican la media y las barras el SEM.

Si calculamos el área bajo la curva de cada uno de los compuestos administrados durante las 8 horas de cinética, sabremos la absorción biodisponible que hemos tenido en plasma durante los 480 minutos hasta que se ha eliminado la dThd y la dCtd (Tabla 33). Esta área bajo la curva es

muy parecida entre la dThd y la dCtd en las administraciones IP e IV, con valores cerca de 150.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{minuto}/\text{L}$ y de 120.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{minuto}/\text{L}$, respectivamente. En el caso de la administración oral en cambio, además de tener un área bajo la curva mucho más pequeña, ésta es diferente entre la dThd y la dCtd. La dThd tiene un área bajo la curva de casi 14.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{minuto}/\text{L}$ mientras que la dCtd apenas sobrepasa los 4.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{minuto}/\text{L}$, 3 veces menos que la dThd. También cabe destacar que, en el caso de la administración oral, los productos de degradación Thy y dUrd alcanzan niveles de área bajo la curva mayores que sus precursores en plasma (del orden del doble o triple respectivamente), evidenciando una rápida degradación de los mismos. Los niveles acumulados de dUrd tras la administración IP también se mantienen bastante altos durante el transcurso de la cinética.

Tabla 33. Área bajo la curva. Cálculos de las áreas bajo la curva durante las 8 horas de las cinéticas oral, IP e IV de los compuestos administrados (dThd y dCtd) y sus primeros productos de degradación (Thy y dUrd, respectivamente). Cálculos realizados con los datos de las gráficas de la Ilustración 16.

Área bajo la curva ($\mu\text{mol}\cdot\text{minuto}/\text{L}$)	dThd	dCtd	Thy	dUrd
Cinética oral	13.839	4.180	26.493	12.948
Cinética IP	145.832	143.696	36.992	114.116
Cinética IV	115.547	126.974	25.522	60.468

Farmacocinéticas en crías de ratón

Teniendo en cuenta que vamos a realizar la administración del tratamiento desde el día 4 postnatal de los ratones, también es importante hacer un análisis de la farmacocinética a edades tempranas. Para ello realizamos cinéticas del tratamiento en ratones más pequeños pero solo por vía oral e IP, dada la complejidad de realizar una administración IV en ratones tan pequeños. La edad de los ratones es de 5 días en la administración oral, y de 7 días en la administración IP. Realizamos la cinética recogiendo muestras de sangre a distintos tiempos durante 5 horas. En esta ocasión, la recogida de muestra implica el sacrificio del ratón, por lo que cada ratón únicamente se puede utilizar para un tiempo. Igual que en las cinéticas de ratones adultos, extrajimos el plasma y cuantificamos la dThd, la dCtd, la Thy y la dUrd.

La observación más llamativa en este caso, es que los niveles de dThd y dCtd que se alcanzan tras la administración oral en las crías de ratón son mucho mayores que los que se alcanzan en los ratones adultos, desvelando diferencias en la biodisponibilidad en función de la edad (Ilustración 17). Durante las 5 horas de la cinética, en la administración oral no se observa un decaimiento claro en las concentraciones de dThd y sobretodo dCtd, lo que nos impide identificar un pico de mayor concentración en plasma de dThd y de dCtd. De hecho, en el último

punto recogido en el gráfico aún se conservan concentraciones altas de ambos compuestos. En la administración IP de las crías de ratones en cambio, el perfil de la cinética de la dThd y la dCtd se parece más al de los ratones adultos, alcanzando concentraciones similares y con el pico de mayor concentración localizado alrededor de la hora después de la administración.

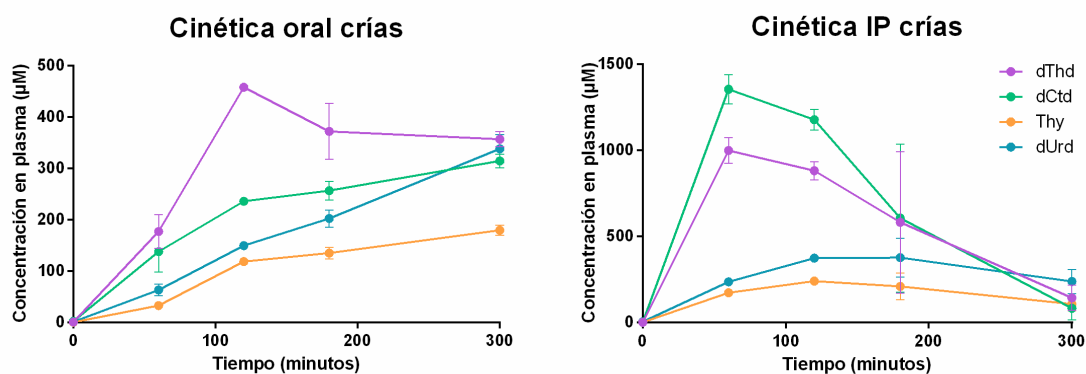


Ilustración 17. Cinéticas de dThd y dCtd (y sus primeros productos de degradación) en plasma de crías de ratón tras su administración oral o IP. Concentraciones en µM de dThd y dCtd así como sus productos de degradación (Thy y dUrd respectivamente) en plasma. Cinéticas realizadas en crías de ratón WT de 5 días en la cinética oral (n=2 en cada punto) y de 7 días en la cinética IP (n=2 en cada punto) tratados con 500 mg/kg de dThd y dCtd. Muestras recogidas a los minutos 0, 60, 120, 180 y 300. Los puntos marcan la media y las barras el SEM.

En base a los resultados sobre biodisponibilidad obtenidos tras la realización de las cinéticas, determinamos que utilizaríamos la vía de administración oral para tratar a los ratones a partir de día 4 postnatal. Como ya hemos mencionado antes, la administración IV es de alta dificultad en ratones tan pequeños y a pesar de que la vía IP en crías de ratón consigue niveles plasmáticos más altos de dThd y dCtd, la manipulación de los ratones a 4 días después del nacimiento es muy complicada. Además la excesiva manipulación de las crías puede hacer que la madre se estrese y rechace a las crías. El control de la administración del tratamiento por vía oral es más sencillo que el IP, donde es más difícil controlar la cantidad de tratamiento que se aplica en cada caso debido a la fragilidad de la piel a estas edades, dado que está muy turgente facilitando la salida del volumen inyectado. También existe el riesgo de pinchar órganos internos debido al reducido tamaño de las crías. Por otro lado, aunque el área bajo la curva en ratones adultos sea, tanto para dThd como para dCtd, muy superior en la administración IP que en la oral (Ilustración 16), esta diferencia no parece tan marcada en el caso de la administración a crías (Ilustración 17). En crías tratadas por vía IP, la concentración plasmática de dThd y dCtd decae mucho más rápidamente que por vía oral dónde la máxima concentración parece prolongarse durante las cinco horas que dura el ensayo. Estudiar en profundidad los efectos metabólicos de la administración oral de dThd y dCtd era además de primordial interés, ya que esta es la vía de administración utilizada tanto por los pacientes deficientes en TK2 bajo tratamiento compasivo,

como por aquellos incluidos en el ensayo clínico para dThd+dCtd que se está desarrollando actualmente. Durante el desarrollo de este proyecto se inicia además de forma paralela una colaboración, con el grupo del Dr. Hirano (Columbia University, NY) que estudia la administración IP de dThd y dCtd en un modelo de ratón *knock-in* deficiente en TK2 [232]. Ambos modelos presentan unas características fenotípicas muy similares, lo que nos permitiría realizar comparaciones que podrían resultar valiosas para la traslación clínica de nuestros estudios.

1.2 Artículo I: Los cambios metabólicos debidos a la edad limitan la eficacia de la terapia basada en desoxirribonucleósidos en ratones deficientes en TK2

Título original: Age-related metabolic changes limit efficacy of deoxynucleoside-based therapy in TK2-deficient mice

Autores: Cora Blázquez-Bermejo, David Molina-Granada, Ferran Vila-Julià, Daniel Jiménez-Heis, Xiaoshan Zhou, Javier Torres-Torronteras, Anna Karlsson, Ramon Martí, Yolanda Cámara

DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.07.042

Revista y año de publicación: EBioMedicine, 2019 Agosto (Epub 2019 Julio 24)

Factor de impacto (FI) y percentil: FI de 6,680; Q1, Primer Decil (JCR 2018)

Resumen: La timidina quinasa 2 (TK2) cataliza la primera fosforilación de los desoxirribonucleosidos (dNs) pirimidínicos, timidina (dThd) y desoxicitidina (dCtd) dentro de la mitocondria. La deficiencia en *TK2* reduce la disponibilidad de dTMP y dCMP, precursores de la síntesis de dTTP y dCTP, y finalmente da lugar a depleción o acumulación de deleciones múltiples del ADNmt. En los pacientes, las mutaciones en *TK2* normalmente se manifiestan como miopatía de progresión rápida con aparición en la infancia, dando lugar a insuficiencia respiratoria y encefalopatía en las presentaciones clínicas más graves.

La administración de dThd+dCtd ha demostrado ser efectiva retrasando la progresión de la enfermedad y prolongando la supervivencia de un modelo murino KI de la enfermedad. En este trabajo, hemos utilizado un modelo murino KO para la *Tk2* (*Tk2*^{KO}) sin actividad residual en TK2, y hemos observado que el tratamiento de dThd+dCtd hace uso de las rutas de salvamento citosólicas alternativas para la síntesis de dNTPs, sugiriendo que esta terapia podría ser beneficiosa para cualquier mutación en *TK2*. La administración oral combinada de 400 mg/kg/día de dThd y dCtd desde el día 4 postnatal, alarga la vida media de los ratones *Tk2*^{KO} desde los 16 hasta los 34 días. Además, atenúa el retraso en el crecimiento y recupera la depleción del ADNmt en el músculo esquelético y otros tejidos diana, pero no en el cerebro. Sin embargo, estos efectos solo los observamos a edades tempranas y los ratones todavía mueren prematuramente.

En este estudio hemos comparado animales diariamente tratados a las edades de 12 o 29 días, encontrando que las concentraciones plasmáticas de dThd y dCtd son notablemente más bajas en los ratones de mayor edad. Además, en los ratones de 29 días la actividad de las enzimas catabólicas, timidina fosforilasa y citidina desaminasa, son marcadamente más altas en el

intestino delgado, un tejido decisivo para los metabolitos administrados oralmente. Por el contrario, la actividad timidina quinasa 1 y desoxicitidina quinasa, las quinasa citosólicas responsables de la activación de la dThd y la dCtd, disminuyen en los tejidos diana durante el desarrollo del ratón. En consecuencia, durante las primeras semanas tras el nacimiento, los ratones experimentan unos cambios ontogénicos muy importantes en el metabolismo de dNs que pueden limitar la eficacia terapéutica de la dThd+dCtd a estadios del desarrollo tempranos. Además, hemos encontrado que la administración de dThd sola tiene el mismo impacto en la supervivencia que la dThd+dCtd, mientras que la dCtd sola no tiene impacto en el aumento de la supervivencia. Por lo tanto, únicamente la dThd es responsable del efecto terapéutico del tratamiento combinado en ratones. La dThd alcanza niveles más altos en plasma cuando se administra sola, y este aumento en la biodisponibilidad da lugar, en estadios tempranos, a niveles superiores de recuperación del ADNmt. Sin embargo, hemos observado que esta respuesta preferente es muy dependiente de cada tejido, indicando que hay diferencias en la homeostasis de dNTPs entre tejidos. Estos cambios relacionados con la edad y las regulaciones metabólicas específicas de cada tejido hacen necesaria más investigación para optimizar la terapia basada en dNs.

1.3 Estudio sobre la competencia de los dNs por la entrada al torrente sanguíneo

Introducción

En los estudios cinéticos descritos previamente, a pesar de administrar la dThd y la dCtd a una misma dosis, observamos que en la administración por vía oral la concentración plasmática de la dThd es siempre más alta que la dCtd (apartado de resultados 1.1). Por otro lado, cuando administrábamos la dThd sola a los ratones, ésta alcanzaba niveles más altos que cuando la administrábamos en combinación con la dCtd (apartado de resultados 1.2). Para estudiar un poco más a fondo la competencia por la entrada de ambos compuestos en el torrente sanguíneo, realizamos una administración puntual de dThd y dCtd (400 mg/kg) en combinación o solas y por vía IP y/u oral, analizando los niveles plasmáticos de los compuestos 1 hora después de su administración.

Material y Métodos

Para realizar estos experimentos utilizamos ratones WT de entre 11 y 16 días, edades en las que los niveles plasmáticos de dThd y dCtd administradas son más altos que en los adultos. En total tenemos 8 condiciones de administración diferentes, combinando la vía oral e IP, con los diferentes tratamientos basados en la dThd sola, la dCtd sola o la combinación de ambas (Ilustración 18). El plasma lo obtuvimos tras el sacrificio de las crías y lo procesamos para su análisis mediante LC-MS/MS tal y como se describe en el apartado de material y métodos 2.5.1.

Resultados y Discusión

Tal y como habíamos visto en los experimentos del apartado de resultados 1.1, tras la administración IP (puntos en color rosa) tanto de dThd como de dCtd, los niveles plasmáticos que obtenemos son mayores que con la administración oral (puntos en color azul) para ambos metabolitos. Además, no se observan diferencias en los niveles de dThd alcanzados tras su administración por vía IP, tanto si se administró sola, o en combinación con dCtd (ya sea ésta administrada por la misma vía IP o por vía oral).

Sin embargo, si nos fijamos en la administración oral de la dThd, vemos que administrándola sola, o en combinación con la dCtd administrada por la vía IP, alcanzamos concentraciones más altas en plasma que si la coadministramos junto con la dCtd pero por la misma vía oral. En cambio, en el caso de la dCtd observamos concentraciones similares en plasma independientemente de si se ha realizado una administración conjunta con la dThd o no. Estos resultados también están incluidos en el apartado de resultados 1.2.

Los compuestos de degradación de la dThd y la dCtd (la Thy y la dUrd), siguen los mismos patrones que sus precursores, con mayores concentraciones tras la administración IP

comparando con la oral. En este caso los colores corresponderán con la vía de administración de sus precursores.

Estos resultados sugieren que existe una competencia por la entrada al torrente sanguíneo entre la dThd y la dCtd cuando se co-administran por vía oral. De este modo, la dThd alcanza una concentración plasmática más elevada si se administra de forma independiente. Este efecto no se observa al utilizar una vía IP, lo que sugiere que la dThd y dCtd compiten por su entrada a través de los transportadores situados en el epitelio intestinal. Por lo que respecta a la dCtd, sus niveles en plasma parecen no verse afectados por el hecho de ser co-administrado con la dThd, pudiéndose justificar por un comportamiento de los transportadores diferente los dos compuestos, o por otros factores como el catabolismo de la dCtd que estén limitando estos niveles.

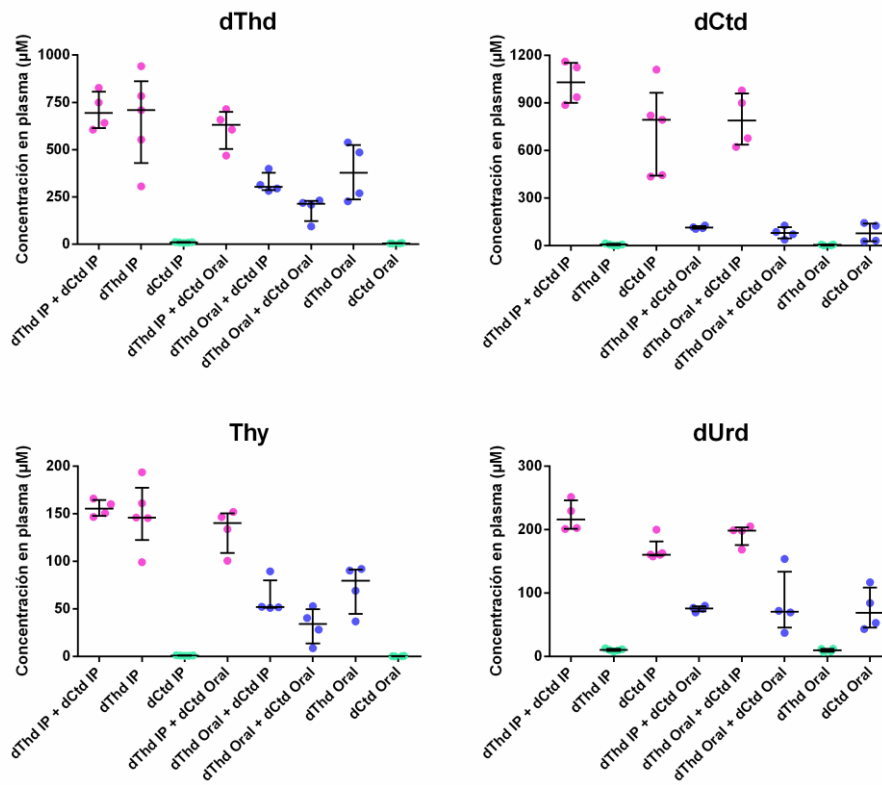


Ilustración 18. Niveles plasmáticos de dThd y dCtd después de su administración puntual. Se muestran las concentraciones de dThd, dCtd, Thy y dUrd en plasma de ratones WT de entre 11 y 16 días por LC-MS/MS. Los colores determinan la vía de administración de cada compuesto (o la de su precursor): rosa para la administración IP, azul para la administración oral, y verde cuando no ha habido administración (niveles basales). La sangre fue recogida una hora más tarde de la administración IP (puntos rosas) y/u oral (puntos azules) de ambos compuestos juntos o por separado a una dosis de 400 mg/kg. Cada punto corresponde a un ratón (n=4 o 5 en cada una de las condiciones), la barra horizontal representa la mediana y las verticales el rango intercuartil.

1.4 Estudio de supervivencia con interrupción del tratamiento

Introducción

Los resultados obtenidos hasta ahora apuntan a que la administración de dThd y dCtd estimula, durante edades tempranas, vías de síntesis de dNTPs alternativas a la catalizada por TK2, aumentando la supervivencia de los ratones. El tratamiento pierde eficacia en algún punto del desarrollo, ya que observamos como con la edad se produce un descenso en la actividad de las enzimas relacionadas con la activación de dThd y dCtd, y un aumento de la actividad de enzimas responsables de su degradación (apartado de resultados 1.2) con la consiguiente disminución de la biodisponibilidad del tratamiento. Pensamos que estos cambios metabólicos debidos a la edad, están relacionados con la pérdida de efecto terapéutico.

Con el objetivo de estudiar si el efecto de la administración diaria de la dThd y la dCtd se mantiene en el tiempo o si podemos identificar el momento en el que deja de ser efectivo, hemos administrado el tratamiento a los ratones comenzando a los 4 días postnatal y hasta los 16 días, edad en la que los ratones *Tk2^{KO}* mueren de forma natural en ausencia de tratamiento.

Material y Métodos

En este caso tratamos los ratones con dThd+dCtd (400 mg/kg/día) desde día 4 hasta 16 postnatal, mediante *gavage* oral diario. Como controles negativo y positivo, utilizamos los ratones tratados con PBS y con dThd+dCtd (400 mg/kg/día) que ya están incluidos en el apartado de resultados 1.2.

Resultados y Discusión

La administración de dThd+dCtd hasta día 16, consigue prolongar la supervivencia hasta los 27 días de mediana (media y desviación estándar, $27 \pm 2,6$; $n=13$), llegando hasta un máximo de 33 días. Por lo que respecta a la progresión del peso, no se observan diferencias con el control positivo hasta los 22 días de edad, donde se empieza a observar un descenso en el mismo. Estos resultados apuntan a que sí que existe un efecto terapéutico que se mantiene en el tiempo, ya que la interrupción del tratamiento no limita la extensión de la supervivencia. No obstante, mantener el tratamiento indefinidamente consigue alargar la supervivencia hasta una mediana de 34 días. Estos datos sugieren que aunque el tratamiento tenga efecto más allá de los 16 días, probablemente haya una edad máxima, entre los 16 y los 34 días, a la que el tratamiento deje de tener efecto (Ilustración 19 y Tabla 34).

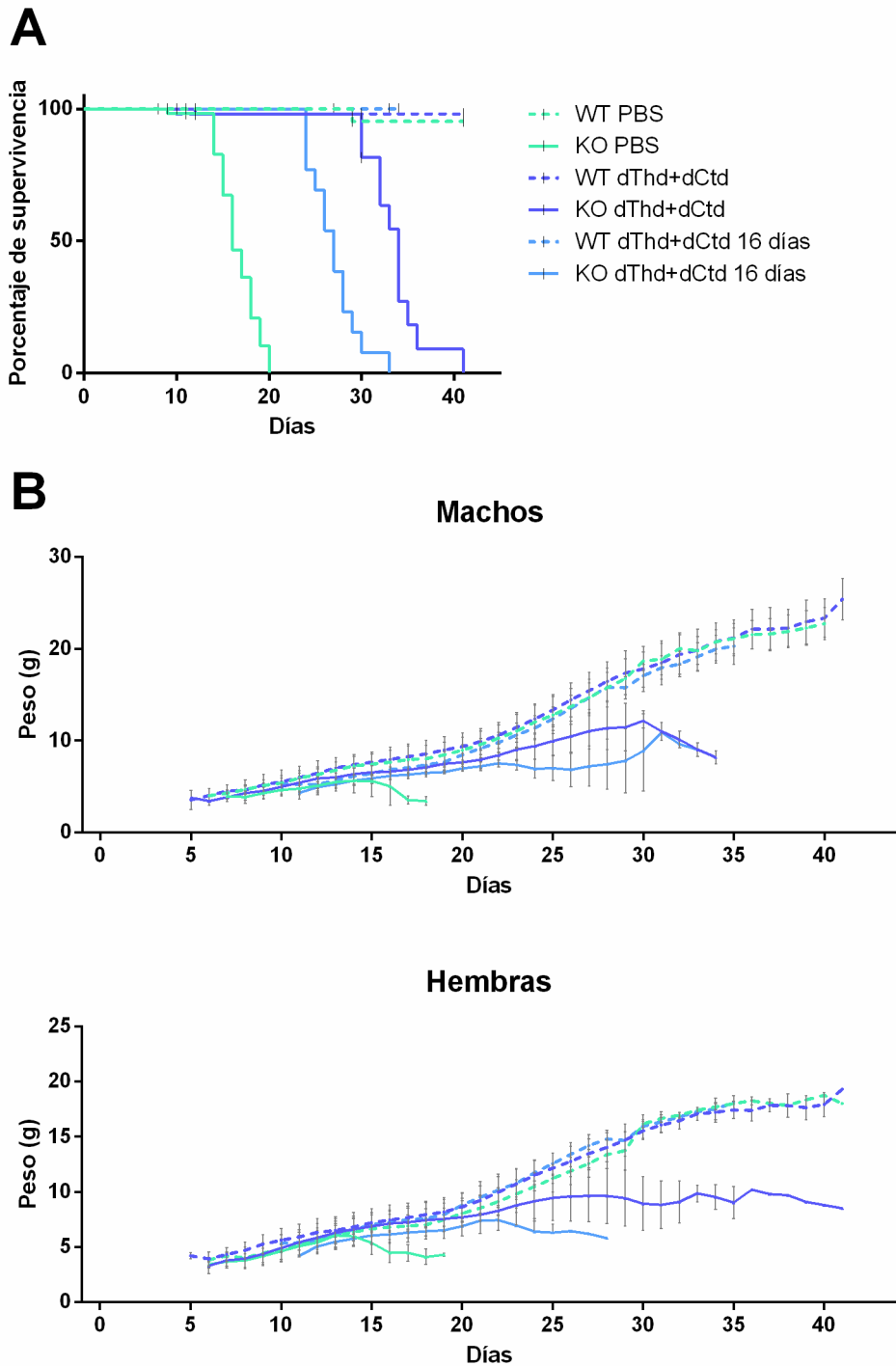


Ilustración 19. El efecto terapéutico se mantiene más allá de la duración del tratamiento en ratones Tk2KO. Los ratones Tk2KO (líneas continuas) y los Tk2WT (líneas discontinuas) han sido tratados diariamente con PBS (vehículo; 10 μ L/g; líneas verdes), con 400 mg/kg/día de dThd+dCtd (líneas azul oscuro) o con 400 mg/kg/día de dThd+dCtd hasta los 16 días (líneas azul claro). A) Proporciones de supervivencia, curva Kaplan-Meier (Tk2KO-dThd+dCtd 16 días, n=13; TK2WT-dThd+dCtd 16 días, n=10). Test Mantel-Cox: Tk2KO-PBS versus Tk2KO-dThd+dCtd-16 días $p < 0,001$; Tk2KO-dThd+dCtd versus Tk2KO-dThd+dCtd-16 días $p < 0,001$. Las observaciones censuradas aparecen como rayas negras in el gráfico. B) Progresión del crecimiento para los ratones (Machos: Tk2KO-dThd+dCtd-16 días, n=8; Tk2WT-dThd+dCtd-16 días, n=5). Hembras: Tk2KO-dThd+dCtd-16 días, n=5; Tk2WT-dThd+dCtd-16 días, n=5). Los resultados están expresados como la media de los valores por cada punto; las barras de error indican la SD.

Tabla 34. Resumen de los datos de supervivencia de los ratones que se muestran en las curvas de Kaplan-Meier de la Ilustración 19 son las que se presentan aquí.

	Sujetos censurados	Muertes	Mediana de supervivencia
WT PBS	46	1	No definido
KO PBS	38	20	16
WT dThd+dCtd (400 mg/kg/día)	54	1	No definido
KO dThd+dCtd (400 mg/kg/día)	36	12	34
WT dThd+dCtd (400 mg/kg/día) 16 días	10	0	No definido
KO dThd+dCtd (400 mg/kg/día) 16 días	0	13	27

1.5 Estudio de la estimulación de la ruta de síntesis *de novo* de los dNTPs

Introducción

Tal y como hemos observado en los resultados de la estimulación de la síntesis de dNTPs por la ruta de salvamento con la administración de dThd y dCtd (apartado de resultados 1.2), existen limitaciones que hacen que el tratamiento únicamente sea efectivo a edades tempranas. Una estrategia que hemos llevado a cabo, ha sido intentar potenciar otras vías metabólicas alternativas que participen en el anabolismo de los dNTPs. Concretamente hemos estimulado la ruta de síntesis *de novo* de nucleósidos de pirimidina con la administración del orotato, un precursor de esta vía.

Material y Métodos

Para poder realizar comparaciones con el tratamiento de dNs que estábamos realizando hasta ahora (400 mg/kg/día de dThd+dCtd), intentamos administrar una dosis molar equivalente de orotato a los ratones. Nos encontramos con que era imposible conseguir una disolución completa en agua a esa concentración (y a un pH compatible con su administración oral), por lo que llevamos a cabo dos estrategias diferentes. Por un lado, administramos una dosis equimolar de la sal potásica de orotato en suspensión (400 mg/kg/día) en agua, comenzando a día 4 postnatal. Por otro lado, decidimos testar la administración conjunta de orotato y dThd+dCtd por si suponía algún efecto aditivo sobre el efecto obtenido con la administración única de estos dos dNs. Para ello, administramos dThd+dCtd a la dosis habitual (400 mg/kg/día) hasta el momento del destete, momento a partir del cual suplementamos el agua de bebida con la sal potásica de orotato (50 mg/kg/día). Estudios en otros modelos anticipan posibles problemas cancerígenos tras la administración crónica de dosis elevadas de este compuesto. Por ello elegimos suplementar el agua de bebida con la dosis más elevada testada como segura en dichos estudios [247]. Como controles negativo y positivo, utilizamos los ratones tratados con PBS y con dThd+dCtd (400 mg/kg/día) que ya están incluidos en el apartado de resultados 1.2.

Resultados y Discusión

Los resultados de la administración del orotato para estimular la ruta de síntesis *de novo* de los dNTPs, ya sea de forma independiente a una dosis equimolar que la dThd y dCtd, o en combinación con dThd+dCtd a dosis más baja, no tiene ningún efecto sobre la supervivencia de los ratones (Ilustración 20 y Tabla 35). Para que la administración del orotato pueda dar lugar a un aumento en los niveles de dNTPs, son necesarias muchas más enzimas intermediarias que si administramos directamente dThd+dCtd. Además, muchas de estas enzimas son dependientes del ciclo celular limitando esto la efectividad del tratamiento como ya hemos visto en el caso de la TK1 con la administración de dThd+dCtd (apartado de resultados 1.2).

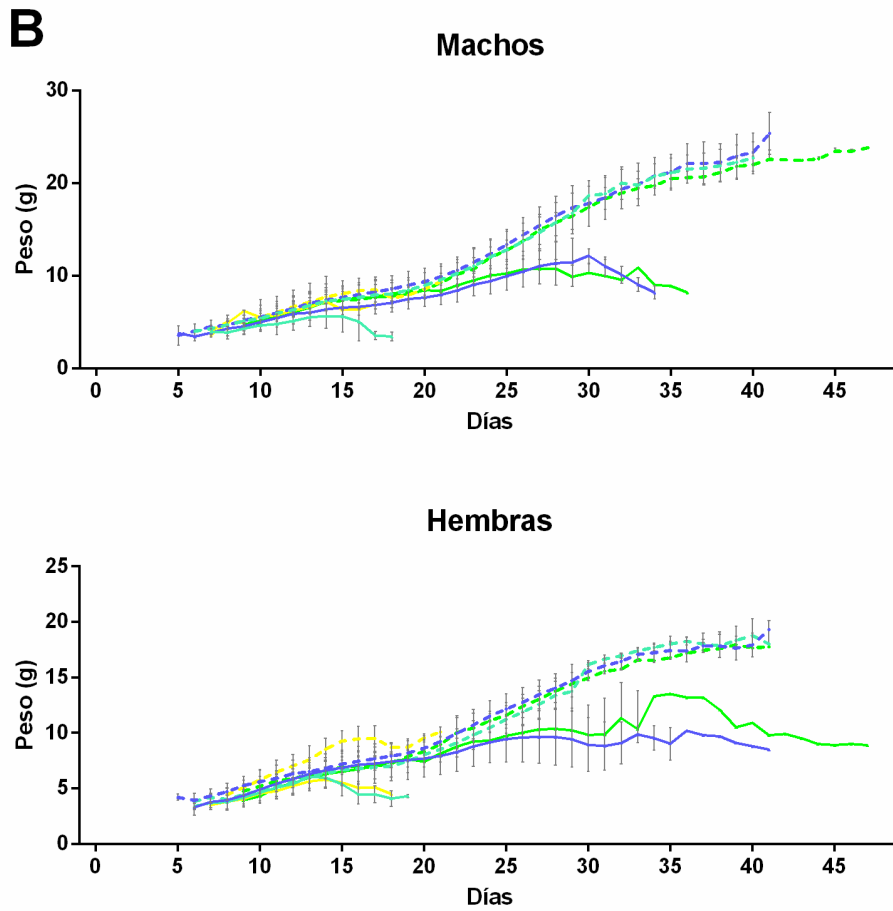
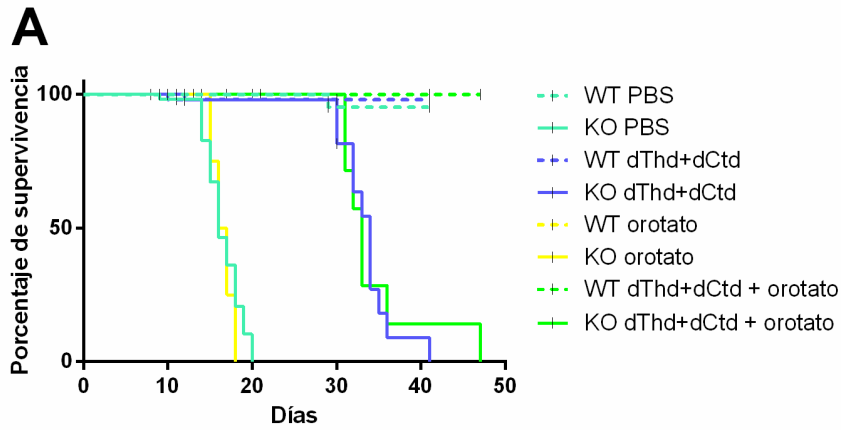


Ilustración 20. La administración diaria de orotato no tiene efecto sobre la supervivencia de ratones Tk2KO. Los ratones Tk2KO (líneas continuas) y los Tk2WT (líneas discontinuas) han sido tratados diariamente con PBS (vehículo; 10 μ L/g; líneas verdes), con 400 mg/kg/día de dThd+dCtd (líneas azules), con 400 mg/kg/día de orotato (líneas amarillas), o con 400 mg/kg/día de dThd+dCtd + 50 mg/kg/día de orotato a partir del día 21 (líneas verde lima). A) Proporciones de supervivencia, curva Kaplan-Meier (Tk2KO-orotato, n=9; Tk2WT-orotato, n=13, Tk2KO-dNs+orotato, n=7; Tk2WT-dNs+orotato, n=15). Test Mantel-Cox: Tk2KO-PBS versus Tk2KO-orotato no significativo; Tk2KO-dThd+dCtd versus Tk2KO p<0,001; Tk2KO-PBS versus Tk2KO-dThd+dCtd+orotato p<0,001; Tk2KO-dThd+dCtd versus Tk2KO-dThd+dCtd+orotato no significativo. Las observaciones censuradas aparecen como rayas negras en el gráfico. B) Progresión del crecimiento para los ratones (Machos: Tk2KO-orotato, n=5; Tk2WT-orotato, n=10, Tk2KO-dThd+dCtd+orotato, n=4; Tk2WT-dThd+dCtd+orotato, n=9. Hembras: Tk2KO-orotato, n=4; Tk2WT-orotato, n=3, Tk2KO-dThd+dCtd+orotato, n=3; Tk2WT-dThd+dCtd+orotato, n=6). Los resultados están expresados como la media de los valores por cada punto; las barras de error indican la SD.

Tabla 35. Resumen de los datos de supervivencia de los ratones que se muestran en las curvas de Kaplan-Meier de la Ilustración 20.

	Sujetos censurados	Muertes	Mediana de supervivencia
WT PBS	46	1	No definido
KO PBS	38	20	16
WT dThd+dCtd (400 mg/kg/día)	54	1	No definido
KO dThd+dCtd (400 mg/kg/día)	36	12	34
WT orotato (400 mg/kg/día)	13	0	No definido
KO orotato (400 mg/kg/día)	1	8	16.5
WT dThd+dCtd (400 mg/kg/día) + orotato (50 mg/kg/día)	15	0	No definido
KO dThd+dCtd (400 mg/kg/día) + orotato (50 mg/kg/día)	0	7	33

2. Artículo II: El incremento del *pool* de dNTPs recupera la depleción del ADNmt en fibroblastos de humanos deficientes en POLG

Título original: Increased dNTP *pools* rescue mtDNA depletion in human POLG-deficient fibroblasts

Autores: Cora Blázquez-Bermejo, Lidia Carreño-Gago, David Molina-Granada, Josu Aguirre, Javier Ramón, Javier Torres-Torronteras, Raquel Cabrera-Pérez, Miguel Ángel Martín, Cristina Domínguez-González, Xavier de la Cruz, Anne Lombès, Elena García-Arumí, Ramon Martí, Yolanda Cámara

DOI: 10.1096/fj.201801591R

Revista y año de publicación: FASEB Journal, 2019 Junio (Epub 2019 Marzo 8)

Factor de impacto (FI) y percentil: FI de 5,391; Q1, Primer Decil (JCR 2018)

Resumen: La polimerasa gamma mitocondrial es un heterotrímero constituido por una subunidad catalítica (POLG) y dos subunidades accesorias (POLG2), y es responsable de la síntesis del ADN mitocondrial (ADNmt). Una actividad defectuosa de la POLG da lugar al síndrome de depleción y deleciones múltiples del ADNmt con un amplio espectro de fenotipos clínicos, desde manifestaciones infantiles y graves a manifestaciones de aparición en edades adultas y leves.

La disponibilidad de los desoxirribonucleótidos (dNTPs) es un factor importante para el mantenimiento del ADNmt. El aumento de la síntesis de dNTPs por suplementación de precursores en forma de desoxirribonucleósidos (dNs) se ha demostrado efectivo en diferentes modelos de depleción del ADNmt debidos a un metabolismo defectuoso de dNTPs. En este trabajo hemos estudiado la recuperación del número de copias de ADNmt después de una depleción forzada con bromuro de etidio (BrEt) en fibroblastos quiescentes procedentes de pacientes con mutaciones en diferentes dominios de POLG. Después del tratamiento con BrEt, todas las células deficientes en POLG experimentan una depleción mayor de ADNmt que los fibroblastos de pacientes sanos, evidenciando un proceso de replicación defectivo. Hemos monitorizado la recuperación del ADNmt después de la eliminación del BrEt en presencia o ausencia de los cuatro dNs y EHNA (inhibidor específico de la degradación de la desoxiadenosina (dAdo)). La activación de la ruta de salvamento de dNTPs por suplementación con dNs+EHNA da lugar a un incremento de los niveles de dNTPs mitocondriales. Bajo estas condiciones, las células

control recuperan espontáneamente el número de copias de ADNmt iniciales con o sin la suplementación de dNs+EHNA mientras que las células deficientes en POLG recuperan los niveles de ADNmt sólo cuando están expuestas al tratamiento, independientemente de la mutación específica que contengan. La preservación de la dAdo y el consecuente incremento de los niveles de dATP mitocondrial son necesarios para esta recuperación. Además, el tratamiento no altera la fidelidad de la POLG dado que no se detecta un incremento en las deleciones múltiples o mutaciones puntuales comprobadas por Next-Generation Sequencing.

Este trabajo evidencia que las mutaciones afectando a la maquinaria de replicación del ADNmt podrían verse beneficiadas por la administración de dNs que induce un incremento en la disponibilidad de dNTPs mitocondriales, y sugiere que esta terapia podría ser efectiva para tratar las deficiencias en POLG así como otras condiciones en las que el correcto mantenimiento del ADNmt se vea comprometido.

DISCUSIÓN

El síndrome de depleción y deleciones múltiples del ADNmt (SDDM), engloba un grupo de enfermedades raras que desde que se relacionaron por primera vez con mutaciones en un gen en el año 1999 no ha dejado de crecer [94]. Durante estos 20 años, y especialmente en los últimos años gracias al desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva, se han identificado nuevos genes implicados en la replicación del ADNmt, y mutaciones en los mismos que causan SDDM. La falta de conocimiento y la alta heterogeneidad fenotípica de estas enfermedades, hace que muchas veces sea difícil su diagnóstico y se realice solamente una evaluación y tratamiento de los síntomas. En los últimos años se ha realizado un gran avance en el diagnóstico de estas enfermedades mitocondriales, pero aún no existen tratamientos efectivos para las mismas.

El uso de los dNs como precursores para aumentar la síntesis de dNTPs y estimula la replicación del ADNmt es una estrategia terapéutica que últimamente está teniendo una gran repercusión en el tratamiento del SDDM. Esto se debe a los buenos resultados obtenidos en experimentos *in vitro* e *in vivo*, pero sobre todo a los resultados positivos en pacientes deficientes en TK2 que como tratamiento compasivo reciben dThd y dCtd. Las quinasas mitocondriales, TK2 y dGK, son las encargadas de fosforilar los dNs a dNMPs y como tratamiento a defectos en estas enzimas, se propuso administrar sus productos de reacción (dNMPs). Es por eso por lo que primeramente los estudios pre-clínicos *in vitro* [183, 186] e *in vivo* [229] consistían en administrar dNMPs. Sin embargo, dado el carácter iónico de los dNMPs y en ausencia de un transportador de membrana conocido, su internalización celular a través de membranas hidrofóbicas es muy improbable. Además se constató que debido a que existen enzimas localizadas en el exterior de la célula como fosfatasa y ectonucleotidasas que desfosforilan estos dNMPs a dNs, la forma en la que entran a la célula y actúan como agentes terapéuticos es la desfosforilada [223]. Nosotros en este trabajo hemos estudiado y profundizado en el uso de los dNs en un modelo murino *KO* para la *Tk2* y en fibroblastos de pacientes con mutaciones en *POLG*.

En el estudio de la deficiencia en TK2, la generación de un modelo murino *KI* para la enfermedad (*Tk2^{KI}*) permitió probar por primera vez *in vivo* la administración de dNs [230]. En estos estudios previos se demostró que la suplementación de dNs podía retrasar la progresión de la enfermedad prolongando la supervivencia de los ratones, pero el tratamiento resultaba efectivo tan solo a edades tempranas. Las investigaciones llevadas a cabo en este modelo murino y los buenos resultados obtenidos aumentando la supervivencia a corto plazo, así como la ausencia de cualquier otro tratamiento efectivo para esta enfermedad con tan mal pronóstico, hicieron posible el uso de los dNs como tratamiento compasivo para pacientes con deficiencia en *TK2*. No obstante el uso clínico compasivo es individualizado, no está disponible en todos los países

y es necesario un ensayo clínico para que muchos otros pacientes puedan beneficiarse de este tratamiento, así como para garantizar la seguridad del mismo. El estudio retrospectivo realizado en los pacientes que están recibiendo dThd y dCtd muestra muy buenos resultados, especialmente en los pacientes infantiles más graves. La administración del tratamiento implica mejoras en la función motora y respiratoria, pero sobre todo aumenta la supervivencia de los pacientes a un 100% hasta por lo menos 2 años después de comenzar con el tratamiento, mientras que la historia natural de la enfermedad muestra que solo el 27% de los pacientes sobrevivían por lo menos dos años después del diagnóstico de la enfermedad [233]. Los pacientes con afectaciones más leves en cambio presentan una mejora más reducida, pero en ambos casos es importante observar que no hay efectos adversos graves.

Para profundizar en las causas que están limitando la efectividad del tratamiento, nosotros hemos trabajado con el modelo $Tk2^{KO}$ que presenta el mismo fenotipo que el ratón $Tk2^{KI}$, y con el que también observamos una respuesta similar al tratamiento con dNs. El uso de este modelo KO , carente de cualquier actividad en la enzima TK2, nos ha permitido confirmar que los dNs administrados utilizan vías alternativas para fosforilarse y no dependen de la actividad residual que pueda quedar de la enzima TK2 mutada. A pesar de que en el modelo $Tk2^{KI}$ la determinación de la actividad de proteína en corazón sea muy reducida o incluso indetectable en cerebro [248], estudios con proteína recombinante con la misma mutación en humanos (H121N) que tiene el modelo $Tk2^{KI}$ de ratón (H126N), determinan que se mantiene la actividad de la enzima cuando utiliza dThd como sustrato, y que disminuye cuando el sustrato es dCtd [249]. Con el estudio en el modelo KO hemos demostrado que cualquier paciente puede beneficiarse de este tratamiento independientemente de la mutación en $TK2$ que tenga y de la actividad residual que esto le suponga.

Como hemos mencionado anteriormente, con la administración de dNs perseguimos la estimulación o activación de la ruta de salvamento mediante los enzimas que catalizan la misma reacción que TK2 en el citosol. Esto implica el transporte de los dNs fosforilados al interior de la mitocondria. Aunque dichos transportadores no han sido identificados, existen evidencias experimentales de su presencia en la membrana mitocondrial [227, 228, 250]. Una de las evidencias de ello la podemos encontrar en los estudios que se realizaron con el modelo $Tk2^{KO}$ donde se sobreexpresaba la desoxirribonucleósido quinasa de *Drosophila melanogaster* (*Dm-dNK*). Esta enzima que se localiza fuera de la mitocondria, fosforila los dNs a dNMPs. La sobreexpresión en el núcleo de *Dm-dNK* da lugar un aumento en el *pool* total de dNTPs a los niveles requeridos para una síntesis eficiente del ADNmt, demostrando así la existencia de transporte de dNMPs citosólicos a la mitocondria [227, 228].

Tal y como hemos visto, la terapia basada en la administración de dThd y dCtd retrasa la progresión de la enfermedad, pero no consigue revertir el fenotipo completo en ningún modelo de ratón deficiente en TK2, lo que resulta en la muerte prematura de los animales (34 días de mediana). En este trabajo hemos descrito cómo cambios en el metabolismo de los dNs relacionados con la edad están contribuyendo a limitar la eficacia del tratamiento. Una de estas limitaciones afecta a la biodisponibilidad del tratamiento (lo que correlaciona con una reducción en la disponibilidad en los tejidos), que con la edad disminuye debido al aumento de la expresión y actividad de las enzimas catabólicas que degradan la dThd y la dCtd. Otro de los factores limitantes es la disminución de la expresión y actividad de las enzimas anabólicas que realizan la misma función que la TK2 en el citosol, la TK1 y la dCK, fosforilando la dThd y dCtd administradas y por tanto son necesarias para su acción terapéutica.

Tal y como demuestran nuestros estudios farmacocinéticos, la vida media de los dNs en plasma es relativamente corta. Dada la correlación existente entre los niveles de dThd y dCtd en plasma y tejidos, mantener una elevada concentración durante el máximo tiempo posible parece importante, dado que los niveles de dNs disponibles en la célula serán los que limiten el *pool* de dNTPs mitocondriales a través de la activación de la ruta de salvamento. Ante un aumento en la disponibilidad de dNs, el efecto sobre el *pool* de dNTPs tiene lugar rápidamente [223] y sabemos que el efecto se mantiene en el tiempo lo suficiente como para incidir positivamente en la síntesis de ADNmt.

Algunas de las diferencias a nivel de expresión y actividad de las enzimas encargadas del metabolismo de dNs también varían en función del tejido o del genotipo del ratón, sugiriendo la influencia de mecanismos compensatorios ante la falta de TK2 o tejido-específicos en el desarrollo del fenotipo y en la respuesta al tratamiento. A día 29 es además complejo saber qué observaciones se deben al genotipo o al tratamiento, ya que los *Tk2*^{KO} sin tratar no sobreviven a esa edad.

Se ha demostrado que existe una respuesta dosis dependiente en cuanto a la supervivencia de los ratones. Esta información en combinación con los datos farmacocinéticos que hemos obtenido podría sugerir que el uso de otras vías de administración como la IP, donde a igual dosis administrada se obtiene mayor biodisponibilidad tanto de dThd como de dCtd, podría mejorar la eficacia del tratamiento. No obstante, los estudios de supervivencia en ratones *Tk2*^{KI} comparando la administración IP con la oral no evidencian diferencias en cuanto a la supervivencia [230, 232]. Esto demuestra que a pesar de darse una respuesta dosis dependiente, existe una concentración a partir de la cual independientemente de la vía de administración que

utilicemos, no conseguimos un aumento de niveles de dNTPs y tampoco el número de copias de ADNmt en los diferentes tejidos [232]. Esta limitación puede deberse tal y como los propios autores indican, a una saturación de los transportadores de nucleósidos [71], sabiendo que la ENT-1 tiene una V_{max} por debajo de los niveles de dThd y dCtd que se consiguen en plasma [251].

Tal y como hemos visto en las farmacocinéticas, la dThd y dCtd se degradan rápidamente dentro del organismo, llegando a niveles basales a las 8 horas en los ratones adultos por cualquier vía de administración estudiada. Una de las estrategias que se podrían llevar a cabo para superar la baja vida media de estos compuestos sería la administración del tratamiento más de una vez al día, para intentar mantener los niveles de dThd y dCtd elevados durante más tiempo. En el caso de los pacientes actualmente en tratamiento, la dosis diaria se reparte en varias tomas [233]. Además esta pauta de administración favorece la reducción de efectos adversos como la diarrea, posiblemente inducida por el shock osmótico que representa una dosis importante de dNs.

Otra de las estrategias que se podrían llevar a cabo para aumentar la disponibilidad de los dNs en el organismo, sería limitar su degradación. Las determinaciones de dThd y dCtd en el plasma de los ratones tratados muestran que la degradación de estos compuestos es mayor con el paso del tiempo. Además, hay más productos de degradación (Thy, dUrd) en relación con los compuestos administrados en los ratones de mayor edad. Por un lado, hemos observado que los niveles que se alcanzan en las cinéticas son mayores en el caso de las crías que en el caso de los ratones adultos. Por otro lado, aquellas enzimas que catalizan el primer paso en la degradación de la dThd y la dCtd, la TP y CDA respectivamente, aumentan su expresión y actividad en la edad adulta. Este aumento se observa principalmente en el intestino, órgano muy importante al tratarse de la primera barrera a la que el tratamiento se enfrenta tras ser administrado de forma oral.

Una estrategia para favorecer la estabilidad de dThd y dCtd en el organismo sería el uso de inhibidores de las enzimas que degradan los dNs. Debido a que algunos análogos de dNs utilizados en tratamientos quimioterápicos son diana de las mismas enzimas catabólicas, la industria farmacéutica ha desarrollado diversos inhibidores específicos con potencial terapéutico. Entre los inhibidores desarrollados para la TP encontramos el tipiracil (thymidine phosphorylase inhibitor, TPI) [252-254]. En el caso de la CDA, la tetrahidrouridina (THU) ha sido ampliamente utilizada [255, 256]. La eficacia tanto del TPI como de la THU se ha establecido no sólo preclínicamente, sino que ambos han sido incluidos en diversos ensayos clínicos en

coadministración con análogos de dNs. La vida media de estos fármacos en sangre es más larga que la de los propios dNs, lo que podría permitir espaciar más las administraciones [257].

Una observación interesante es que administrar los inhibidores por vías de administración distintas y con cierta antelación a los propios dNs, conlleva un mayor aumento de la biodisponibilidad [257]. No hay que obviar que el uso de inhibidores es controvertido, dada la implicación que pueden tener en el desarrollo de otras enfermedades. Inhibir en exceso las enzimas TP y CDA provocaría un acúmulo de dNs que podría resultar tóxico. Sabemos por ejemplo que mutaciones en la TP dan lugar a una pérdida en su actividad catalítica y por tanto a acumulación de sus sustratos, dThd y dUrd, en el organismo, dando lugar a la enfermedad de MNGIE [258]. En cualquier caso, el objetivo sería la realización de una inhibición parcial de la actividad de estas enzimas catabólicas para favorecer la estabilidad de la dThd y dCtd administradas.

Es cierto que en estudios previos con el modelo *Tk2^{Ki}* se probó la administración de la THU en combinación con dThd y dCtd para intentar aumentar la biodisponibilidad de ésta última. En este caso, con la administración conjunta por vía oral de dTMP+dCMP+THU, no se observó un aumento en la supervivencia de los ratones. El uso de la THU no daba lugar a alteraciones en los niveles de dTMP y dCMP en el hígado, pero disminuía los niveles de dTMP en el cerebro de los ratones a los 13 días. Sin embargo, desconocemos si la coadministración de dTMP+dCMP con la THU repercutía directamente en el aumento de la biodisponibilidad de la dCtd, y se trataba de un estudio con un número muy limitado de ratones [230]. Algunos estudios muestran que la administración oral de THU en ratones no es tan eficaz como la IV, donde aumenta su vida media y mantiene la biodisponibilidad de la dCtd durante más tiempo [257]. Por tanto, pensamos que sería interesante seguir investigando esta opción probando diferentes pautas del tratamiento, variando las vías de administración y concentraciones.

El hecho de que los inhibidores se utilicen hoy en día como terapia para el cáncer hace más fácil su posible uso como parte del tratamiento en un futuro. Muchos de los compuestos que se utilizan en ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes cánceres son tanto análogos de los dNs como inhibidores específicos de sus enzimas de degradación. La información preclínica y clínica existente sobre el uso de estos fármacos puede facilitar su uso como complemento para terapias basadas en los dNs para el SDDM. Cabe destacar que, en nuestro caso, el uso de estos inhibidores plantea un reto adicional, ya que se plantearían como parte de un tratamiento crónico que debería administrarse de por vida en ausencia de alternativas terapéuticas. Esto implica la necesidad de implementar estudios preclínicos de seguridad a largo plazo.

En base a nuestros resultados parece que únicamente la dThd es la responsable del aumento de la supervivencia de los ratones tratados con ambos dNs, mientras que la administración de la dCtd, por lo menos en nuestras condiciones experimentales, no conlleva ninguna mejora adicional en la supervivencia. La enzima TK1 (que cataliza la fosforilación de la dThd) está regulada por el ciclo celular, mientras que la actividad dCK (que cataliza la fosforilación de la dCtd) se mantiene en células quiescentes, y esto podría justificar que la dCtd no sea tan necesaria en este tratamiento (la actividad basal de dCK aportaría el dCMP necesario sin necesidad de un aporte extra de dCtd). Por otro lado, la disponibilidad tanto en plasma como tisular de dCtd es muy inferior a la de dThd tras el tratamiento, por lo que cabe la posibilidad de que no hayamos alcanzado unos niveles con repercusión terapéutica en nuestros ratones.

Otra de las limitaciones de las que hemos hablado es la disminución de la actividad anabólica de las enzimas TK1 y dCK con la edad. Estas actividades citosólicas son necesarias en la activación de dThd y dCtd como agentes terapéuticos, ya que en ausencia de actividad TK2 serán responsables de su fosforilación a dTMP y dCMP respectivamente, paso crucial en la consiguiente formación de dTTP y dCTP finales. Como ya sabemos, la TK1 está muy regulada durante el ciclo celular, y tiene mayor expresión en las primeras etapas del desarrollo. De hecho, la muerte de los animales *Tk2*^{KO} se había correlacionado en trabajos previos con la pérdida de actividad TK1 en órganos vitales como corazón o cerebro [248].

En nuestro laboratorio hemos determinado las actividades TK1 y dCK en diferentes órganos y durante los 29 primeros días de desarrollo en ratones *WT* (trabajo final de master de Daniel Jiménez Heis, con el título “Estudi de les activitats TK1 i dCK durant el desenvolupament murí: relació amb l’efectivitat del tractament del dèficit de TK2 amb nucleòsids”). Observamos que ambas actividades, pero sobre todo la actividad TK1, disminuyen bruscamente en todos los órganos estudiados durante los primeros 9 días de vida. En el cerebro se observa una dependencia mayor de TK2 durante los 29 días, dado que su actividad es muy superior a la de dCK y TK1, de hecho, esta última pasa a ser indetectable a partir del día 9 postnatal. En el músculo, hígado y corazón, la actividad TK1 desciende hasta igualarse con la TK2 a los 9 días, mientras que la actividad dCK va disminuyendo más paulatinamente hasta igualarse con la TK2 a los 18 días. A pesar de ello, los ratones *Tk2*^{KO} sobreviven hasta una mediana de 16 días, sugiriéndonos que el efecto de la acción de TK1 se mantiene durante un tiempo. Esta observación también se corrobora con el estudio de la administración de dNs con interrupción del tratamiento a los 16 días. Las consecuencias de la actividad de la TK1 mientras administramos el tratamiento, mantiene su efecto hasta los 27 días de mediana que sobreviven los ratones. En nuestro trabajo también hemos visto que la expresión y actividad de TK1

disminuye desde día 12 a día 29. Sin embargo, a día 29 en los ratones *Tk2^{KO}* se observa un aumento en la expresión en respuesta a la exposición al tratamiento. Por el contrario, este aumento en la expresión de TK1 en ratones *Tk2^{KO}* no se ve reflejado en la actividad de la enzima en los órganos estudiados. En cambio, la actividad dCK no presenta una disminución tan acusada, sugiriendo que la dCtd no sería tan indispensable para el tratamiento y que la pérdida de efectividad del tratamiento sería debida a la disminución de actividad TK1.

También hemos investigado otra posible opción para estimular la síntesis de dNTPs a través de la vía de la síntesis *de novo*. Para ello hemos administrado el orotato como precursor de la síntesis de ribonucleótidos de pirimidina. El orotato es un compuesto que se utiliza hoy en día para aumentar la resistencia y la tolerancia al ejercicio en dosis bajas, pero también se ha relacionado con la generación de tumores a dosis altas [247]. Nosotros hemos administrado diferentes dosis sin ninguna consecuencia sobre la supervivencia de los ratones. Probablemente este compuesto se encuentre muy alejado en la cadena de síntesis de dNTPs, y haya muchas reacciones intermedias necesarias y dependientes del ciclo celular que limitan que pueda llegar a dar lugar a un aumento en los niveles de dNTPs y la consecuente estimulación de la síntesis del ADNmt. Recientemente se ha descrito como en otro modelo de SDDM, como es el *zebrafish KO* para la MPV17, el ácido orótico parece tener un efecto positivo aumentando el contenido en ADNmt [259].

Todos los resultados obtenidos en este trabajo nos ayudan a entender mejor el metabolismo de dNTPs en la deficiencia de TK2, para poder conocer y afrontar las limitaciones del tratamiento basado en la administración de dThd y dCtd. Además, está en marcha la realización de un ensayo clínico para el cual es indispensable el máximo conocimiento de todos los aspectos relacionados con la terapia y su seguridad. Es importante ser consciente de que no todos los resultados obtenidos con el modelo de ratón son trasladables a los humanos. El modelo murino con el que hemos trabajado tiene una afectación muy grave, principalmente en el cerebro, simulando el más grave de los fenotipos de los pacientes con deficiencia en TK2. No obstante, el fenotipo más habitual en los pacientes suele ser esencialmente miopatía. Otra de las observaciones del estudio ha sido que el efecto terapéutico del tratamiento se debe a la dThd, obteniendo la misma supervivencia que los ratones con el tratamiento combinado de dThd+dCtd, e incluso un mayor aumento en el número de copias de ADNmt en cerebro e hígado. El músculo en cambio, el órgano más afectado en humanos, presenta una mayor recuperación del ADNmt con dThd+dCtd, por lo que en humanos, no parecería conveniente limitar el tratamiento al uso exclusivo de la dThd. Otros modelos de defectos en el metabolismo de dNTPs muestran fenotipos con diferencias importantes respecto a las manifestaciones clínicas en humanos [198,

206]. Esto sugiere que el metabolismo de dNTPs no es el mismo en los humanos que en los ratones y que las limitaciones del tratamiento puedan ser diferentes a las que hemos mencionado en este trabajo. Lo cierto es que hasta ahora el tratamiento en humanos es efectivo no solo en edades infantiles, sino que también lo es, aunque en menor medida, en edades adultas [233]. Por el momento no podemos descartar que, al igual que en el modelo murino, el tratamiento deje de ser efectivo con el tiempo en humanos que han sido tratados desde la infancia. No podremos saberlo hasta ver la evolución de estos pacientes a más largo plazo.

Este estudio y los resultados del tratamiento de dThd+dCtd en el modelo murino *Tk2^{KO}*, nos sugieren que esta estrategia también podría ser efectiva para otros defectos en el metabolismo de dNs como es la dGK. Esta enzima se encarga de fosforilar los dNs de purina (dAdo y dGuo) a dNMPs igual que hace la TK2 con los dNs de pirimidina. Además de experimentos con cultivos celulares derivados de pacientes con deficiencia en dGK [223], hay evidencias en experimentos *in vivo* con un modelo *zebrafish KO* para la dGK, donde la suplementación de dAdo y dGuo da lugar a un aumento de ADNmt en el hígado [193]. Recientemente se ha descrito la creación del modelo murino con deficiencia en dGK con gran depleción en el hígado, donde sería muy interesante probar el tratamiento de dAdo+dGuo [210].

Como hemos visto, la administración de dNs estimula la síntesis de dNTPs. Este aumento de dNTPs intramitocondrial, a su vez, favorece la síntesis del ADNmt. Algunas mutaciones en la subunidad catalítica de la polimerasa mitocondrial, POLG, afectan a su afinidad por los dNTPs y por tanto aumentar la concentración de éstos, podría favorecer la polimerización del ADNmt.

Para el estudio de la deficiencia en POLG y su posible beneficio de un tratamiento basado en dNs, hemos trabajado con un modelo *in vitro* de la enfermedad debido a la falta de disponibilidad de un modelo *in vivo*. Las mutaciones en *POLG* son la causa más prevalente de defectos en la replicación del ADNmt. A pesar de ser la primera causa de SDDM, aun no hay terapias disponibles más allá de las sintomáticas. La primera limitación que nos encontramos para estudiar esta enfermedad es que no existen muchos modelos deficientes en POLG con depleción, dificultando esto su estudio. Las mutaciones que conllevan la pérdida total de la función son incompatibles con el desarrollo embrionario [200], y los modelos disponibles mejor caracterizados afectan a la actividad exonucleasa de la POLG dando lugar a un fenotipo distinto al que observamos en SDDM [239, 240, 260].

En los primeros experimentos que se realizaron para la deficiencia en POLG, se utilizaron modelos *in vitro* de células musculares. Es cierto que en los SDDM el músculo es uno de los órganos más afectados, pero en el caso de la deficiencia en POLG la afectación suele ser

principalmente del SNC y algunas veces hepática. Como primera estrategia se les administró dAMP y dGMP, utilizando las mismas condiciones que para la deficiencia en dGK [183]. Seguidamente se realizó la administración de los 4 dNTPs con mejores resultados recuperando el ADNmt [184].

Nosotros hemos utilizado un modelo *in vitro* de fibroblastos derivadas de pacientes con mutaciones en diferentes dominios funcionales de POLG. Estas células no presentan ningún fenotipo molecular como depleción o deleciones múltiples del ADNmt, por lo que para nuestro estudio utilizamos un modelo experimental en el que forzamos la depleción del ADNmt mediante la adición de un agente que interfiere de forma transitoria con la replicación, el BrEt. Una vez retirado el BrEt, analizamos la recuperación del número de copias del ADNmt, proceso durante el cual defectos en la replicación se evidencian como un retraso o incapacidad para reestablecer los niveles de ADNmt inicial. Con la idea de que el aporte de dNs y la estimulación de la ruta de salvamento conduciría a un incremento de la concentración de dNTPs mitocondrial que podría favorecer la síntesis del ADNmt, nuestro tratamiento ha consistido en los 4 dNs.

Resultados previos del laboratorio demostraron que la dAdo es el dN más inestable en medio de cultivo celular [223], por ello también hemos utilizado la EHNA como inhibidor específico de la ADA, responsable de la degradación de la dAdo, para evitar que rápidamente se catabolice en el medio de cultivo. El tratamiento combinado de los dNs+EHNA ha puesto en evidencia que por lo menos en estas células, es necesario un incremento de dATP para lograr la recuperación del número de copias de ADNmt en estas células.

Es importante señalar, que en un inicio pensábamos que únicamente aquellos pacientes con mutaciones que se localizaran en las regiones de unión de la proteína a dNTPs, o que de algún modo afectasen a la afinidad del enzima por los dNTPs, se podrían ver beneficiados de este tratamiento. Lo cierto es que hemos trabajado con fibroblastos de pacientes con mutaciones que afectaban a diferentes dominios de POLG y en muchos casos lejos de la región de unión a los dNTPs. En todos ellos los resultados indican que la adición de dNs estimula la replicación del ADNmt. Por eso proponemos que la terapia basada en dNs podría ser beneficiosa para todos los pacientes con mutaciones en *POLG* debido a una aceleración de la polimerización y un aumento de la tasa de incorporación de dNTPs.

A pesar de administrar la misma concentración de los 4 dNs, el aumento de los dNTPs no es proporcional. Este hecho refleja que controlar la composición de los *pools* a través de la

administración de dNs o inhibidores enzimáticos puede ser compleja, ya que el efecto sobre los distintos componentes del *pool* varía en su magnitud.

Por otro lado, probablemente no existe la misma demanda por los 4 dNTPs, siendo algunos más indispensables que otros en función del órgano o tejido en el que nos encontremos. En el modelo de fibroblastos utilizado, por ejemplo, el aumento de dATP es indispensable para recuperar las copias de ADNmt, mientras que el dGTP no se incrementa tanto con la estimulación y esto no supone ninguna limitación para aumentar la síntesis del ADNmt. Lo que evidenciamos es que la concentración de dNTPs limita la replicación del ADNmt, pero los requerimientos por una especie en concreto pueden variar en función de los tejidos.

Una de las preocupaciones de este aumento de los dNTPs era que esto pudiera producir un aumento en las mutaciones puntuales del ADNmt, sobre todo si esta terapia se quiere trasladar a un uso en pacientes. Forzar una polimerasa que está defectuosa podría dar lugar a un incremento en la mutagénesis del ADNmt. Nosotros hemos secuenciado el ADNmt y no hemos detectado aparición de deleciones ni un aumento en las mutaciones puntuales. No podemos excluir que el incremento en la mutagénesis del ADN nuclear pueda ser otra de las consecuencias del tratamiento. El aumento en el *pool* de dNTPs mitocondriales o su desequilibrio tras la administración de los dNs podrían afectar al *pool* de dNTPs citosólico. Varios trabajos han descrito que un desequilibrio de dNTPs pueden resultar mutagénico [261-263], por lo que por seguridad, será necesario abordar este tema en futuras investigaciones del grupo.

Como ya hemos comentado previamente, otra de las cuestiones limitantes para usar esta terapia en pacientes es el uso de inhibidores del catabolismo de dNs, como la EHNA. En este modelo *in vitro* hemos visto que es indispensable para causar un aumento en los niveles de dATP y recuperar el ADNmt. Aunque la EHNA se ha utilizado exclusivamente de forma experimental, existen otros inhibidores de la ADA que cataliza la degradación de dAdo como la pentostatina que sí que se está utilizando en ensayos clínicos como terapia contra el cáncer Pentostatina [264, 265]. *In vivo*, la vida media de ambos dNs de purina es muy baja [45], implicando la necesidad de incluir no solo un inhibidor de dAdo sino también de la dGuo. La PNP es en este caso la enzima que se encarga de catalizar el primer paso en la degradación de la dGuo y la forodesina (*immucilin H*) es uno de los inhibidores que podríamos utilizar para inhibir su acción [266]. Sin embargo, tanto PNP como ADA son enzimas cuyas deficiencias dan lugar a enfermedades inmunodeficientes graves, por lo que estudios preclínicos futuros en modelos *in vivo* serán necesarios para demostrar la eficacia y seguridad de una terapia basada en el aporte de dNs e inhibidores específicos de su catabolismo.

En conjunto, tanto para la deficiencia en TK2 como para la deficiencia en POLG los resultados del uso de los dNs son muy prometedores a pesar de que aún existen limitaciones. Además, el punto en que se encuentra cada una de las investigaciones es muy diferente, siendo el ensayo clínico el siguiente paso en el caso de la TK2, y la necesidad de un modelo *in vivo* para poder seguir desarrollando la terapia en el caso de la POLG.

Una de las observaciones más llamativas de nuestro estudio ha sido el aumento en la síntesis de ADNmt de los diferentes órganos estudiados tras la administración de dNs en ratones *WT*. Por tanto, los dNs pueden incrementar el ADNmt incluso en condiciones fisiológicas normales, lo cual indica que la concentración de dNTPs mitocondriales podría estar limitando su replicación. Esto es muy interesante porque podría ser indicativo de una inducción de biogénesis mitocondrial con efectos positivos para todas aquellas enfermedades donde la síntesis del ADNmt está comprometida. De confirmarse, podría resultar beneficioso no sólo para SDDM, sino también por ejemplo para las mutaciones puntuales en el ADNmt donde aumentar el número de copias se ha utilizado como estrategia para mejorar la función mitocondrial [267-269].

Así pues, sugerimos que la terapia basada en los dNs se podría considerar para tratar no solo a los pacientes deficientes en *TK2* y *POLG*, sino a otros pacientes con defectos en la replicación del ADNmt que se puedan beneficiar de un aumento en los niveles de dNTPs mitocondriales.

La terapia génica es otra de las estrategias que hoy en día se está desarrollando no sólo para SDDM [221, 222], sino para muchas otras enfermedades [270]. Por desgracia muchas de estas terapias han llegado a ensayos clínicos donde han fracasado debido a la complejidad que comportan. Es por eso que hasta que dispongamos de ellas y en ausencia de terapias alternativas, la administración de dNs y sus buenos resultados en experimentos *in vivo* nos ofrecen esperanza para tratar a muchos pacientes con SDDM sin opción terapéutica en la actualidad.

CONCLUSIONES

1. La administración de dThd y dCtd resulta efectiva en ausencia total de actividad TK2, lo cual indica que la fosforilación de estos dNs tiene lugar a través de rutas citosólicas alternativas para la síntesis de dNTPs. Por tanto, esta terapia resulta indicada en el tratamiento de pacientes con cualquier mutación en TK2.
2. A edades tempranas, la administración oral de dThd y dCtd prolonga la supervivencia, retrasa la progresión de la enfermedad y contrarresta la depleción del ADNmt en diversos tejidos de ratones *KO* para *Tk2*. El efecto terapéutico se pierde a las pocas semanas de tratamiento.
3. Únicamente la dThd es responsable del efecto terapéutico observado tras la administración de dThd y dCtd en ratones *KO* para *Tk2*.
4. Los ratones experimentan importantes cambios metabólicos durante el desarrollo que limitan la efectividad del tratamiento. La actividad de las principales enzimas que catalizan la degradación de dThd y dCtd (TP y CDA) aumenta con la edad, especialmente en intestino, lo que reduce la biodisponibilidad del tratamiento administrado por vía oral. Por otro lado, la actividad de las quinasas necesarias para la activación del tratamiento (dCK y TK1) desciende con la edad, o ya es muy baja a edades tempranas en tejidos diana relevantes como el cerebro.
5. El tratamiento con dNs induce un aumento en el contenido de los cuatro dNTPs mitocondriales, y restituye la capacidad replicativa del ADNmt sin alterar su fidelidad, en células con mutaciones en *POLG*.
6. La administración de dNs estimula la síntesis de ADNmt independientemente de la mutación específica o dominio funcional de *POLG* afectado. Incluso en ratones sanos, este tratamiento induce un aumento en el número de copias de ADNmt, lo cual sugiere que la replicación se ve limitada en condiciones fisiológicas normales por la concentración de dNTPs mitocondriales.
7. La suplementación con dNs podría ser una estrategia terapéutica válida para SDDM distintos a la deficiencia en TK2 o *POLG*, así como para otras enfermedades en las que un incremento en la síntesis del ADNmt pueda resultar beneficioso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Archibald, J.M. (2015). Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current biology : CB* 25, R911-921.
2. Roger, A.J., Munoz-Gomez, S.A., and Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current biology : CB* 27, R1177-R1192.
3. Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology* 14, 255-274.
4. Gray, M.W. (2017). Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. *Molecular biology of the cell* 28, 1285-1287.
5. Vafai, S.B., and Mootha, V.K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491, 374-383.
6. Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual review of genetics* 39, 359-407.
7. Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145-1159.
8. Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J., and Lithgow, T. (2006). Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 313, 314-318.
9. Ylikallio, E., and Suomalainen, A. (2012). Mechanisms of mitochondrial diseases. *Annals of medicine* 44, 41-59.
10. Gorman, G.S., Chinnery, P.F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D.R., Zeviani, M., and Turnbull, D.M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature reviews. Disease primers* 2, 16080.
11. Calvo, S.E., and Mootha, V.K. (2010). The mitochondrial proteome and human disease. *Annual review of genomics and human genetics* 11, 25-44.
12. Schon, E.A., DiMauro, S., and Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature reviews. Genetics* 13, 878-890.
13. Zeviani, M., and Di Donato, S. (2004). Mitochondrial disorders. *Brain : a journal of neurology* 127, 2153-2172.
14. Miller, F.J., Rosenfeldt, F.L., Zhang, C., Linnane, A.W., and Nagley, P. (2003). Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic acids research* 31, e61.
15. Lang, B.F., Gray, M.W., and Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual review of genetics* 33, 351-397.
16. Bogenhagen, D.F. (2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 914-920.
17. Gilkerson, R., Bravo, L., Garcia, I., Gaytan, N., Herrera, A., Maldonado, A., and Quintanilla, B. (2013). The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a011080.
18. Holt, I.J., He, J., Mao, C.C., Boyd-Kirkup, J.D., Martinsson, P., Sembongi, H., Reyes, A., and Spelbrink, J.N. (2007). Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion* 7, 311-321.
19. Kukat, C., Wurm, C.A., Spahr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.G., and Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 13534-13539.
20. Kaguni, L.S. (2004). DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annual review of biochemistry* 73, 293-320.
21. Graziewicz, M.A., Longley, M.J., and Copeland, W.C. (2006). DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chemical reviews* 106, 383-405.
22. Lim, S.E., Longley, M.J., and Copeland, W.C. (1999). The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive

- DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *The Journal of biological chemistry* 274, 38197-38203.
23. Carrodeguas, J.A., Theis, K., Bogenhagen, D.F., and Kisker, C. (2001). Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase gamma, Pol gamma B, functions as a homodimer. *Molecular cell* 7, 43-54.
 24. Fan, L., Kim, S., Farr, C.L., Schaefer, K.T., Randolph, K.M., Tainer, J.A., and Kaguni, L.S. (2006). A novel processive mechanism for DNA synthesis revealed by structure, modeling and mutagenesis of the accessory subunit of human mitochondrial DNA polymerase. *Journal of molecular biology* 358, 1229-1243.
 25. Young, M.J., and Copeland, W.C. (2016). Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Current opinion in genetics & development* 38, 52-62.
 26. Milenkovic, D., Matic, S., Kuhl, I., Ruzzenente, B., Freyer, C., Jemt, E., Park, C.B., Falkenberg, M., and Larsson, N.G. (2013). TWINKLE is an essential mitochondrial helicase required for synthesis of nascent D-loop strands and complete mtDNA replication. *Human molecular genetics* 22, 1983-1993.
 27. Zhang, H., Barcelo, J.M., Lee, B., Kohlhagen, G., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., and Pommier, Y. (2001). Human mitochondrial topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10608-10613.
 28. Sobek, S., and Boege, F. (2014). DNA topoisomerases in mtDNA maintenance and ageing. *Experimental gerontology* 56, 135-141.
 29. Wanrooij, S., Fuste, J.M., Farge, G., Shi, Y., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2008). Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11122-11127.
 30. Fuste, J.M., Wanrooij, S., Jemt, E., Granycome, C.E., Cluett, T.J., Shi, Y., Atanassova, N., Holt, I.J., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2010). Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Molecular cell* 37, 67-78.
 31. Ngo, H.B., Lovely, G.A., Phillips, R., and Chan, D.C. (2014). Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation. *Nature communications* 5, 3077.
 32. Copeland, W.C., and Longley, M.J. (2014). Mitochondrial genome maintenance in health and disease. *DNA repair* 19, 190-198.
 33. Duxin, J.P., Dao, B., Martinsson, P., Rajala, N., Guittat, L., Campbell, J.L., Spelbrink, J.N., and Stewart, S.A. (2009). Human Dna2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein. *Molecular and cellular biology* 29, 4274-4282.
 34. Zheng, L., Zhou, M., Guo, Z., Lu, H., Qian, L., Dai, H., Qiu, J., Yakubovskaya, E., Bogenhagen, D.F., Demple, B., et al. (2008). Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates. *Molecular cell* 32, 325-336.
 35. Falkenberg, M. (2018). Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway. *Essays in biochemistry* 62, 287-296.
 36. Fernandez-Silva, P., Enriquez, J.A., and Montoya, J. (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental physiology* 88, 41-56.
 37. Miralles Fuste, J., Shi, Y., Wanrooij, S., Zhu, X., Jemt, E., Persson, O., Sabouri, N., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2014). In vivo occupancy of mitochondrial single-stranded DNA binding protein supports the strand displacement mode of DNA replication. *PLoS genetics* 10, e1004832.
 38. Uhler, J.P., and Falkenberg, M. (2015). Primer removal during mammalian mitochondrial DNA replication. *DNA repair* 34, 28-38.

39. Pohjoismaki, J.L., and Goffart, S. (2011). Of circles, forks and humanity: Topological organisation and replication of mammalian mitochondrial DNA. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33, 290-299.
40. Reyes, A., Kazak, L., Wood, S.R., Yasukawa, T., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. (2013). Mitochondrial DNA replication proceeds via a 'bootlace' mechanism involving the incorporation of processed transcripts. *Nucleic acids research* 41, 5837-5850.
41. Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11, 872-884.
42. Ranieri, M., Brajkovic, S., Riboldi, G., Ronchi, D., Rizzo, F., Bresolin, N., Corti, S., and Comi, G.P. (2013). Mitochondrial fusion proteins and human diseases. *Neurology research international* 2013, 293893.
43. El-Hattab, A.W., Dai, H., Almannai, M., Wang, J., Faqeih, E.A., Al Asmari, A., Saleh, M.A.M., Elamin, M.A.O., Alfadhel, M., Alkuraya, F.S., et al. (2017). Molecular and clinical spectra of FBXL4 deficiency. *Human mutation* 38, 1649-1659.
44. Gal, A., Balicza, P., Weaver, D., Naghdi, S., Joseph, S.K., Varnai, P., Gyuris, T., Horvath, A., Nagy, L., Seifert, E.L., et al. (2017). MSTO1 is a cytoplasmic pro-mitochondrial fusion protein, whose mutation induces myopathy and ataxia in humans. *EMBO molecular medicine* 9, 967-984.
45. Rampazzo, C., Miazzi, C., Franzolin, E., Pontarin, G., Ferraro, P., Frangini, M., Reichard, P., and Bianchi, V. (2010). Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutation research* 703, 2-10.
46. Young, J.D. (2016). The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: a 30-year collaborative odyssey. *Biochemical Society transactions* 44, 869-876.
47. Pastor-Anglada, M., and Perez-Torras, S. (2018). Emerging Roles of Nucleoside Transporters. *Frontiers in pharmacology* 9, 606.
48. Gonzalez-Vioque, E., Torres-Torronteras, J., Andreu, A.L., and Marti, R. (2011). Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS genetics* 7, e1002035.
49. Hofer, A., Crona, M., Logan, D.T., and Sjoberg, B.M. (2012). DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 47, 50-63.
50. Hakansson, P., Hofer, A., and Thelander, L. (2006). Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *The Journal of biological chemistry* 281, 7834-7841.
51. Pontarin, G., Fijolek, A., Pizzo, P., Ferraro, P., Rampazzo, C., Pozzan, T., Thelander, L., Reichard, P.A., and Bianchi, V. (2008). Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17801-17806.
52. Bourdon, A., Minai, L., Serre, V., Jais, J.P., Sarzi, E., Aubert, S., Chretien, D., de Lonlay, P., Paquis-Flucklinger, V., Arakawa, H., et al. (2007). Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nature genetics* 39, 776-780.
53. Ke, P.Y., and Chang, Z.F. (2004). Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Molecular and cellular biology* 24, 514-526.
54. Hu, C.M., Yeh, M.T., Tsao, N., Chen, C.W., Gao, Q.Z., Chang, C.Y., Lee, M.H., Fang, J.M., Sheu, S.Y., Lin, C.J., et al. (2012). Tumor cells require thymidylate kinase to prevent dUTP incorporation during DNA repair. *Cancer cell* 22, 36-50.
55. Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K., and Eklund, H. (2002). Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59, 1327-1346.

56. Johansson, M., and Karlsson, A. (1997). Cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human thymidine kinase 2. *The Journal of biological chemistry* 272, 8454-8458.
57. Johansson, M., and Karlsson, A. (1996). Cloning and expression of human deoxyguanosine kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7258-7262.
58. Sherley, J.L., and Kelly, T.J. (1988). Human cytosolic thymidine kinase. Purification and physical characterization of the enzyme from HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* 263, 375-382.
59. Chottiner, E.G., Shewach, D.S., Datta, N.S., Ashcraft, E., Gribbin, D., Ginsburg, D., Fox, I.H., and Mitchell, B.S. (1991). Cloning and expression of human deoxycytidine kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1531-1535.
60. Wang, L. (2010). Deoxynucleoside salvage enzymes and tissue specific mitochondrial DNA depletion. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 29, 370-381.
61. Besse, A., Wu, P., Bruni, F., Donti, T., Graham, B.H., Craigen, W.J., McFarland, R., Moretti, P., Lalani, S., Scott, K.L., et al. (2015). The GABA transaminase, ABAT, is essential for mitochondrial nucleoside metabolism. *Cell metabolism* 21, 417-427.
62. Kowluru, A., Tannous, M., and Chen, H.Q. (2002). Localization and characterization of the mitochondrial isoform of the nucleoside diphosphate kinase in the pancreatic beta cell: evidence for its complexation with mitochondrial succinyl-CoA synthetase. *Archives of biochemistry and biophysics* 398, 160-169.
63. Bianchi, V., and Sychala, J. (2003). Mammalian 5'-nucleotidases. *The Journal of biological chemistry* 278, 46195-46198.
64. Rampazzo, C., Gallinaro, L., Milanesi, E., Frigimelica, E., Reichard, P., and Bianchi, V. (2000). A deoxyribonucleotidase in mitochondria: involvement in regulation of dNTP pools and possible link to genetic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8239-8244.
65. Carter, C.W., Jr. (1995). The nucleoside deaminases for cytidine and adenosine: structure, transition state stabilization, mechanism, and evolution. *Biochimie* 77, 92-98.
66. Reichard, P. (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annual review of biochemistry* 57, 349-374.
67. Markert, M.L. (1991). Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immunodeficiency reviews* 3, 45-81.
68. Giblett, E.R., Anderson, J.E., Cohen, F., Pollara, B., and Meuwissen, H.J. (1972). Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* 2, 1067-1069.
69. Goldstone, D.C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J.J., Groom, H.C., Rice, G.I., Christodoulou, E., Walker, P.A., Kelly, G., Haire, L.F., Yap, M.W., et al. (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* 480, 379-382.
70. Mauney, C.H., and Hollis, T. (2018). SAMHD1: Recurring roles in cell cycle, viral restriction, cancer, and innate immunity. *Autoimmunity* 51, 96-110.
71. Young, J.D., Yao, S.Y., Baldwin, J.M., Cass, C.E., and Baldwin, S.A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Molecular aspects of medicine* 34, 529-547.
72. Molina-Arcas, M., Casado, F.J., and Pastor-Anglada, M. (2009). Nucleoside transporter proteins. *Current vascular pharmacology* 7, 426-434.
73. Pastor-Anglada, M., Urtasun, N., and Perez-Torras, S. (2018). Intestinal Nucleoside Transporters: Function, Expression, and Regulation. *Comprehensive Physiology* 8, 1003-1017.

74. Smith, K.M., Slugoski, M.D., Cass, C.E., Baldwin, S.A., Karpinski, E., and Young, J.D. (2007). Cation coupling properties of human concentrative nucleoside transporters hCNT1, hCNT2 and hCNT3. *Molecular membrane biology* 24, 53-64.
75. Smith, K.M., Slugoski, M.D., Loewen, S.K., Ng, A.M., Yao, S.Y., Chen, X.Z., Karpinski, E., Cass, C.E., Baldwin, S.A., and Young, J.D. (2005). The broadly selective human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT3) exhibits novel cation-coupled nucleoside transport characteristics. *The Journal of biological chemistry* 280, 25436-25449.
76. Hu, H., Endres, C.J., Chang, C., Umapathy, N.S., Lee, E.W., Fei, Y.J., Itagaki, S., Swaan, P.W., Ganapathy, V., and Unadkat, J.D. (2006). Electrophysiological characterization and modeling of the structure activity relationship of the human concentrative nucleoside transporter 3 (hCNT3). *Molecular pharmacology* 69, 1542-1553.
77. Baldwin, S.A., Beal, P.R., Yao, S.Y., King, A.E., Cass, C.E., and Young, J.D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 447, 735-743.
78. Lai, Y., Tse, C.M., and Unadkat, J.D. (2004). Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *The Journal of biological chemistry* 279, 4490-4497.
79. Govindarajan, R., Leung, G.P., Zhou, M., Tse, C.M., Wang, J., and Unadkat, J.D. (2009). Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 296, G910-922.
80. Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488.
81. Koopman, W.J., Distelmaier, F., Smeitink, J.A., and Willems, P.H. (2013). OXPHOS mutations and neurodegeneration. *The EMBO journal* 32, 9-29.
82. Hakonen, A.H., Davidzon, G., Salemi, R., Bindoff, L.A., Van Goethem, G., Dimauro, S., Thorburn, D.R., and Suomalainen, A. (2007). Abundance of the POLG disease mutations in Europe, Australia, New Zealand, and the United States explained by single ancient European founders. *European journal of human genetics : EJHG* 15, 779-783.
83. Lake, N.J., Compton, A.G., Rahman, S., and Thorburn, D.R. (2016). Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of neurology* 79, 190-203.
84. Skladal, D., Halliday, J., and Thorburn, D.R. (2003). Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain : a journal of neurology* 126, 1905-1912.
85. Ryan, E., King, M.D., Rustin, P., Mayne, P.D., Brown, G.K., Monavari, A.A., Walsh, R., and Treacy, E.P. (2006). Mitochondrial cytopathies, phenotypic heterogeneity and a high incidence. *Irish medical journal* 99, 262-264.
86. Gorman, G.S., Schaefer, A.M., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E.L., Alston, C.L., Feeney, C., Horvath, R., Yu-Wai-Man, P., Chinnery, P.F., et al. (2015). Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of neurology* 77, 753-759.
87. Luo, S., Valencia, C.A., Zhang, J., Lee, N.C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., et al. (2018). Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 13039-13044.
88. Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
89. Koopman, W.J., Willems, P.H., and Smeitink, J.A. (2012). Monogenic mitochondrial disorders. *The New England journal of medicine* 366, 1132-1141.

90. Chinnery, P.F. (1993). Mitochondrial Disorders Overview. In GeneReviews((R)), M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA)).
91. El-Hattab, A.W., and Scaglia, F. (2013). Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 10, 186-198.
92. Moraes, C.T., Shanske, S., Tritschler, H.J., Aprille, J.R., Andreetta, F., Bonilla, E., Schon, E.A., and DiMauro, S. (1991). mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *American journal of human genetics* 48, 492-501.
93. Ashley, N., Adams, S., Slama, A., Zeviani, M., Suomalainen, A., Andreu, A.L., Naviaux, R.K., and Poulton, J. (2007). Defects in maintenance of mitochondrial DNA are associated with intramitochondrial nucleotide imbalances. *Human molecular genetics* 16, 1400-1411.
94. Nishino, I., Spinazzola, A., and Hirano, M. (1999). Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283, 689-692.
95. Lightowers, R.N., Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2015). Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science* 349, 1494-1499.
96. Spinazzola, A., Invernizzi, F., Carrara, F., Lamantea, E., Donati, A., Dirocco, M., Giordano, I., Meznaric-Petrusa, M., Baruffini, E., Ferrero, I., et al. (2009). Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *Journal of inherited metabolic disease* 32, 143-158.
97. Viscomi, C., and Zeviani, M. (2017). MtDNA-maintenance defects: syndromes and genes. *Journal of inherited metabolic disease* 40, 587-599.
98. McClelland, C., Manousakis, G., and Lee, M.S. (2016). Progressive External Ophthalmoplegia. *Current neurology and neuroscience reports* 16, 53.
99. Tang, S., Dimberg, E.L., Milone, M., and Wong, L.J. (2012). Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)-like phenotype: an expanded clinical spectrum of POLG1 mutations. *Journal of neurology* 259, 862-868.
100. Shaibani, A., Shchelochkov, O.A., Zhang, S., Katsonis, P., Lichtarge, O., Wong, L.J., and Shinawi, M. (2009). Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy due to mutations in RRM2B. *Archives of neurology* 66, 1028-1032.
101. Cohen, B.H., Chinnery, P.F., and Copeland, W.C. (1993). POLG-Related Disorders. In GeneReviews((R)), M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA)).
102. Suomalainen, A., and Isohanni, P. (2010). Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscular disorders : NMD* 20, 429-437.
103. El-Hattab, A.W., Craigen, W.J., and Scaglia, F. (2017). Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1863, 1539-1555.
104. Camara, Y., Gonzalez-Vioque, E., Scarpelli, M., Torres-Torronteras, J., and Marti, R. (2013). Feeding the deoxyribonucleoside salvage pathway to rescue mitochondrial DNA. *Drug discovery today* 18, 950-957.
105. Stumpf, J.D., Saneto, R.P., and Copeland, W.C. (2013). Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a011395.
106. Cohen, B.H., and Naviaux, R.K. (2010). The clinical diagnosis of POLG disease and other mitochondrial DNA depletion disorders. *Methods* 51, 364-373.
107. Lamantea, E., Tiranti, V., Bordoni, A., Toscano, A., Bono, F., Servidei, S., Papadimitriou, A., Spelbrink, H., Silvestri, L., Casari, G., et al. (2002). Mutations of mitochondrial DNA

- polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Annals of neurology* 52, 211-219.
108. Saneto, R.P., Cohen, B.H., Copeland, W.C., and Naviaux, R.K. (2013). Alpers-Huttenlocher syndrome. *Pediatric neurology* 48, 167-178.
 109. Wong, L.J., Naviaux, R.K., Brunetti-Pierri, N., Zhang, Q., Schmitt, E.S., Truong, C., Milone, M., Cohen, B.H., Wical, B., Ganesh, J., et al. (2008). Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. *Human mutation* 29, E150-172.
 110. Hikmat, O., Tzoulis, C., Chong, W.K., Chentouf, L., Klingenberg, C., Fratter, C., Carr, L.J., Prabhakar, P., Kumaraguru, N., Gissen, P., et al. (2017). The clinical spectrum and natural history of early-onset diseases due to DNA polymerase gamma mutations. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 19, 1217-1225.
 111. Young, M.J., Longley, M.J., Li, F.Y., Kasiviswanathan, R., Wong, L.J., and Copeland, W.C. (2011). Biochemical analysis of human POLG2 variants associated with mitochondrial disease. *Human molecular genetics* 20, 3052-3066.
 112. Craig, K., Young, M.J., Blakely, E.L., Longley, M.J., Turnbull, D.M., Copeland, W.C., and Taylor, R.W. (2012). A p.R369G POLG2 mutation associated with adPEO and multiple mtDNA deletions causes decreased affinity between polymerase gamma subunits. *Mitochondrion* 12, 313-319.
 113. Young, M.J., Humble, M.M., DeBalsi, K.L., Sun, K.Y., and Copeland, W.C. (2015). POLG2 disease variants: analyses reveal a dominant negative heterodimer, altered mitochondrial localization and impaired respiratory capacity. *Human molecular genetics* 24, 5184-5197.
 114. Van Maldergem, L., Besse, A., De Paepe, B., Blakely, E.L., Appadurai, V., Humble, M.M., Piard, J., Craig, K., He, L., Hella, P., et al. (2017). POLG2 deficiency causes adult-onset syndromic sensory neuropathy, ataxia and parkinsonism. *Annals of clinical and translational neurology* 4, 4-14.
 115. Varma, H., Faust, P.L., Iglesias, A.D., Lagana, S.M., Wou, K., Hirano, M., DiMauro, S., Mansukani, M.M., Hoff, K.E., Nagy, P.L., et al. (2016). Whole exome sequencing identifies a homozygous POLG2 missense variant in an infant with fulminant hepatic failure and mitochondrial DNA depletion. *European journal of medical genetics* 59, 540-545.
 116. Goffart, S., Cooper, H.M., Tynismaa, H., Wanrooij, S., Suomalainen, A., and Spelbrink, J.N. (2009). Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling. *Human molecular genetics* 18, 328-340.
 117. Nikali, K., Suomalainen, A., Saharinen, J., Kuokkanen, M., Spelbrink, J.N., Lonqvist, T., and Peltonen, L. (2005). Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Human molecular genetics* 14, 2981-2990.
 118. Pierce, S.B., Gulsuner, S., Stapleton, G.A., Walsh, T., Lee, M.K., Mandell, J.B., Morales, A., Klevit, R.E., King, M.C., and Rogers, R.C. (2016). Infantile onset spinocerebellar ataxia caused by compound heterozygosity for Twinkle mutations and modeling of Twinkle mutations causing recessive disease. *Cold Spring Harbor molecular case studies* 2, a001107.
 119. Hakonen, A.H., Isohanni, P., Paetau, A., Herva, R., Suomalainen, A., and Lonqvist, T. (2007). Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain : a journal of neurology* 130, 3032-3040.
 120. Picca, A., and Lezza, A.M. (2015). Regulation of mitochondrial biogenesis through TFAM-mitochondrial DNA interactions: Useful insights from aging and calorie restriction studies. *Mitochondrion* 25, 67-75.
 121. Stiles, A.R., Simon, M.T., Stover, A., Eftekharian, S., Khanlou, N., Wang, H.L., Magaki, S., Lee, H., Partynski, K., Dorrani, N., et al. (2016). Mutations in TFAM, encoding

- mitochondrial transcription factor A, cause neonatal liver failure associated with mtDNA depletion. *Molecular genetics and metabolism* *119*, 91-99.
122. Nicholls, T.J., Nadalutti, C.A., Motori, E., Sommerville, E.W., Gorman, G.S., Basu, S., Hoberg, E., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F., Larsson, N.G., et al. (2018). Topoisomerase 3alpha Is Required for Decatenation and Segregation of Human mtDNA. *Molecular cell* *69*, 9-23 e26.
 123. Reyes, A., Melchionda, L., Nasca, A., Carrara, F., Lamantea, E., Zanolini, A., Lamperti, C., Fang, M., Zhang, J., Ronchi, D., et al. (2015). RNASEH1 Mutations Impair mtDNA Replication and Cause Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy. *American journal of human genetics* *97*, 186-193.
 124. Uhler, J.P., Thorn, C., Nicholls, T.J., Matic, S., Milenkovic, D., Gustafsson, C.M., and Falkenberg, M. (2016). MGME1 processes flaps into ligatable nicks in concert with DNA polymerase gamma during mtDNA replication. *Nucleic acids research* *44*, 5861-5871.
 125. Kornblum, C., Nicholls, T.J., Haack, T.B., Scholer, S., Peeva, V., Danhauser, K., Hallmann, K., Zsurka, G., Rorbach, J., Iuso, A., et al. (2013). Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multisystemic mitochondrial disease. *Nature genetics* *45*, 214-219.
 126. Hebbar, M., Girisha, K.M., Srivastava, A., Bielas, S., and Shukla, A. (2017). Homozygous c.359del variant in MGME1 is associated with early onset cerebellar ataxia. *European journal of medical genetics* *60*, 533-535.
 127. Ronchi, D., Di Fonzo, A., Lin, W., Bordoni, A., Liu, C., Fassone, E., Pagliarani, S., Rizzuti, M., Zheng, L., Filosto, M., et al. (2013). Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. *American journal of human genetics* *92*, 293-300.
 128. Phowthongkum, P., and Sun, A. (2017). Novel truncating variant in DNA2-related congenital onset myopathy and ptosis suggests genotype-phenotype correlation. *Neuromuscular disorders : NMD* *27*, 616-618.
 129. Van Goethem, G., Dermaut, B., Lofgren, A., Martin, J.J., and Van Broeckhoven, C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature genetics* *28*, 211-212.
 130. Longley, M.J., Clark, S., Yu Wai Man, C., Hudson, G., Durham, S.E., Taylor, R.W., Nightingale, S., Turnbull, D.M., Copeland, W.C., and Chinnery, P.F. (2006). Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia. *American journal of human genetics* *78*, 1026-1034.
 131. Spelbrink, J.N., Li, F.Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q.P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., et al. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature genetics* *28*, 223-231.
 132. Chanprasert, S., Wang, J., Weng, S.W., Enns, G.M., Boue, D.R., Wong, B.L., Mendell, J.R., Perry, D.A., Sahenk, Z., Craigen, W.J., et al. (2013). Molecular and clinical characterization of the myopathic form of mitochondrial DNA depletion syndrome caused by mutations in the thymidine kinase (TK2) gene. *Molecular genetics and metabolism* *110*, 153-161.
 133. Alston, C.L., Schaefer, A.M., Raman, P., Solaroli, N., Krishnan, K.J., Blakely, E.L., He, L., Craig, K., Roberts, M., Vyas, A., et al. (2013). Late-onset respiratory failure due to TK2 mutations causing multiple mtDNA deletions. *Neurology* *81*, 2051-2053.
 134. Paradas, C., Gutierrez Rios, P., Rivas, E., Carbonell, P., Hirano, M., and DiMauro, S. (2013). TK2 mutation presenting as indolent myopathy. *Neurology* *80*, 504-506.
 135. Behin, A., Jardel, C., Claeys, K.G., Fagart, J., Louha, M., Romero, N.B., Laforet, P., Eymard, B., and Lombes, A. (2012). Adult cases of mitochondrial DNA depletion due to TK2 defect: an expanding spectrum. *Neurology* *78*, 644-648.
 136. Dimmock, D.P., Zhang, Q., Dionisi-Vici, C., Carrozzo, R., Shieh, J., Tang, L.Y., Truong, C., Schmitt, E., Sifry-Platt, M., Lucili, S., et al. (2008). Clinical and molecular features of

- mitochondrial DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase. *Human mutation* 29, 330-331.
137. Ronchi, D., Garone, C., Bordoni, A., Gutierrez Rios, P., Calvo, S.E., Ripolone, M., Ranieri, M., Rizzuti, M., Villa, L., Magri, F., et al. (2012). Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions. *Brain : a journal of neurology* 135, 3404-3415.
 138. Caporali, L., Bello, L., Tagliavini, F., La Morgia, C., Maresca, A., Di Vito, L., Liguori, R., Valentino, M.L., Cecchin, D., Pegoraro, E., et al. (2018). DGUOK recessive mutations in patients with CPEO, mitochondrial myopathy, parkinsonism and mtDNA deletions. *Brain : a journal of neurology* 141, e3.
 139. Tynismaa, H., Ylikallio, E., Patel, M., Molnar, M.J., Haller, R.G., and Suomalainen, A. (2009). A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *American journal of human genetics* 85, 290-295.
 140. Fratter, C., Raman, P., Alston, C.L., Blakely, E.L., Craig, K., Smith, C., Evans, J., Seller, A., Czermin, B., Hanna, M.G., et al. (2011). RRM2B mutations are frequent in familial PEO with multiple mtDNA deletions. *Neurology* 76, 2032-2034.
 141. Pitceathly, R.D., Smith, C., Fratter, C., Alston, C.L., He, L., Craig, K., Blakely, E.L., Evans, J.C., Taylor, J., Shabbir, Z., et al. (2012). Adults with RRM2B-related mitochondrial disease have distinct clinical and molecular characteristics. *Brain : a journal of neurology* 135, 3392-3403.
 142. Hirano, M., Marti, R., Spinazzola, A., Nishino, I., and Nishigaki, Y. (2004). Thymidine phosphorylase deficiency causes MNGIE: an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 23, 1217-1225.
 143. Ferraro, P., Pontarin, G., Crocco, L., Fabris, S., Reichard, P., and Bianchi, V. (2005). Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: a possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *The Journal of biological chemistry* 280, 24472-24480.
 144. Pontarin, G., Ferraro, P., Valentino, M.L., Hirano, M., Reichard, P., and Bianchi, V. (2006). Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *The Journal of biological chemistry* 281, 22720-22728.
 145. Saada, A., Shaag, A., Mandel, H., Nevo, Y., Eriksson, S., and Elpeleg, O. (2001). Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nature genetics* 29, 342-344.
 146. Mandel, H., Szargel, R., Labay, V., Elpeleg, O., Saada, A., Shalata, A., Anbinder, Y., Berkowitz, D., Hartman, C., Barak, M., et al. (2001). The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nature genetics* 29, 337-341.
 147. Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141, 280-289.
 148. Silva Ramos, E., Motori, E., Bruser, C., Kuhl, I., Yeroslaviz, A., Ruzzenente, B., Kauppila, J.H.K., Busch, J.D., Hultenby, K., Habermann, B.H., et al. (2019). Mitochondrial fusion is required for regulation of mitochondrial DNA replication. *PLoS genetics* 15, e1008085.
 149. Elachouri, G., Vidoni, S., Zanna, C., Pattyn, A., Boukhaddaoui, H., Gaget, K., Yu-Wai-Man, P., Gasparre, G., Sarzi, E., Delettre, C., et al. (2011). OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome research* 21, 12-20.
 150. Carelli, V., Sabatelli, M., Carrozzo, R., Rizza, T., Schimpf, S., Wissinger, B., Zanna, C., Rugolo, M., La Morgia, C., Caporali, L., et al. (2015). 'Behr syndrome' with OPA1 compound heterozygote mutations. *Brain : a journal of neurology* 138, e321.

151. Spiegel, R., Saada, A., Flannery, P.J., Burte, F., Soiferman, D., Khayat, M., Eisner, V., Vladovski, E., Taylor, R.W., Bindoff, L.A., et al. (2016). Fatal infantile mitochondrial encephalomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy and optic atrophy associated with a homozygous OPA1 mutation. *Journal of medical genetics* 53, 127-131.
152. Rouzier, C., Bannwarth, S., Chaussonot, A., Chevrollier, A., Verschueren, A., Bonello-Palot, N., Fragaki, K., Cano, A., Pouget, J., Pellissier, J.F., et al. (2012). The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain : a journal of neurology* 135, 23-34.
153. Vielhaber, S., Debska-Vielhaber, G., Peeva, V., Schoeler, S., Kudin, A.P., Minin, I., Schreiber, S., Dengler, R., Kollwe, K., Zusratner, W., et al. (2013). Mitofusin 2 mutations affect mitochondrial function by mitochondrial DNA depletion. *Acta neuropathologica* 125, 245-256.
154. Morena, J., Gupta, A., and Hoyle, J.C. (2019). Charcot-Marie-Tooth: From Molecules to Therapy. *International journal of molecular sciences* 20.
155. Huemer, M., Karall, D., Schossig, A., Abdenur, J.E., Al Jasmi, F., Biagosch, C., Distelmaier, F., Freisinger, P., Graham, B.H., Haack, T.B., et al. (2015). Clinical, morphological, biochemical, imaging and outcome parameters in 21 individuals with mitochondrial maintenance defect related to FBXL4 mutations. *Journal of inherited metabolic disease* 38, 905-914.
156. Almannai, M., Dai, H., El-Hattab, A.W., and Wong, L.J.C. (1993). FBXL4-Related Encephalomyopathic Mitochondrial DNA Depletion Syndrome. In *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA)).
157. Amati-Bonneau, P., Valentino, M.L., Reynier, P., Gallardo, M.E., Bornstein, B., Boissiere, A., Campos, Y., Rivera, H., de la Aleja, J.G., Carroccia, R., et al. (2008). OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain : a journal of neurology* 131, 338-351.
158. Stewart, J.D., Hudson, G., Yu-Wai-Man, P., Blakeley, E.L., He, L., Horvath, R., Maddison, P., Wright, A., Griffiths, P.G., Turnbull, D.M., et al. (2008). OPA1 in multiple mitochondrial DNA deletion disorders. *Neurology* 71, 1829-1831.
159. Bonnen, P.E., Yarham, J.W., Besse, A., Wu, P., Faqeih, E.A., Al-Asmari, A.M., Saleh, M.A., Eyaid, W., Hadeel, A., He, L., et al. (2013). Mutations in FBXL4 cause mitochondrial encephalopathy and a disorder of mitochondrial DNA maintenance. *American journal of human genetics* 93, 471-481.
160. Donkervoort, S., Sabouny, R., Yun, P., Gauquelin, L., Chao, K.R., Hu, Y., Al Khatib, I., Topf, A., Mohassel, P., Cummings, B.B., et al. (2019). MSTO1 mutations cause mtDNA depletion, manifesting as muscular dystrophy with cerebellar involvement. *Acta neuropathologica*.
161. El-Hattab, A.W., and Scaglia, F. (1993). SUCLG1-Related Mitochondrial DNA Depletion Syndrome, Encephalomyopathic Form with Methylmalonic Aciduria. In *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA)).
162. El-Hattab, A.W., and Scaglia, F. (1993). SUCLA2-Related Mitochondrial DNA Depletion Syndrome, Encephalomyopathic Form with Methylmalonic Aciduria. In *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA)).
163. Louro, P., Ramos, L., Robalo, C., Cancelinha, C., Dinis, A., Veiga, R., Pina, R., Rebelo, O., Pop, A., Diogo, L., et al. (2016). Phenotyping GABA transaminase deficiency: a case description and literature review. *Journal of inherited metabolic disease* 39, 743-747.
164. Kaukonen, J., Juselius, J.K., Tiranti, V., Kyttala, A., Zeviani, M., Comi, G.P., Keranen, S., Peltonen, L., and Suomalainen, A. (2000). Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289, 782-785.

165. Komaki, H., Fukazawa, T., Houzen, H., Yoshida, K., Nonaka, I., and Goto, Y. (2002). A novel D104G mutation in the adenine nucleotide translocator 1 gene in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia patients with mitochondrial DNA with multiple deletions. *Annals of neurology* *51*, 645-648.
166. Siciliano, G., Tessa, A., Petrini, S., Mancuso, M., Bruno, C., Grieco, G.S., Malandrini, A., DeFlorio, L., Martini, B., Federico, A., et al. (2003). Autosomal dominant external ophthalmoplegia and bipolar affective disorder associated with a mutation in the ANT1 gene. *Neuromuscular disorders : NMD* *13*, 162-165.
167. Palmieri, L., Alberio, S., Pisano, I., Lodi, T., Meznaric-Petrusa, M., Zidar, J., Santoro, A., Scarcia, P., Fontanesi, F., Lamantea, E., et al. (2005). Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Human molecular genetics* *14*, 3079-3088.
168. Echaniz-Laguna, A., Chassagne, M., Ceresuela, J., Rouvet, I., Padet, S., Acquaviva, C., Nataf, S., Vinzio, S., Bozon, D., and Mousson de Camaret, B. (2012). Complete loss of expression of the ANT1 gene causing cardiomyopathy and myopathy. *Journal of medical genetics* *49*, 146-150.
169. Thompson, K., Majd, H., Dallabona, C., Reinson, K., King, M.S., Alston, C.L., He, L., Lodi, T., Jones, S.A., Fattal-Valevski, A., et al. (2016). Recurrent De Novo Dominant Mutations in SLC25A4 Cause Severe Early-Onset Mitochondrial Disease and Loss of Mitochondrial DNA Copy Number. *American journal of human genetics* *99*, 1405.
170. Mayr, J.A., Haack, T.B., Graf, E., Zimmermann, F.A., Wieland, T., Haberberger, B., Superti-Furga, A., Kirschner, J., Steinmann, B., Baumgartner, M.R., et al. (2012). Lack of the mitochondrial protein acylglycerol kinase causes Sengers syndrome. *American journal of human genetics* *90*, 314-320.
171. Haghghi, A., Haack, T.B., Atiq, M., Mottaghi, H., Haghghi-Kakhki, H., Bashir, R.A., Ahting, U., Feichtinger, R.G., Mayr, J.A., Rotig, A., et al. (2014). Sengers syndrome: six novel AGK mutations in seven new families and review of the phenotypic and mutational spectrum of 29 patients. *Orphanet journal of rare diseases* *9*, 119.
172. Dalla Rosa, I., Camara, Y., Durigon, R., Moss, C.F., Vidoni, S., Akman, G., Hunt, L., Johnson, M.A., Grocott, S., Wang, L., et al. (2016). MPV17 Loss Causes Deoxynucleotide Insufficiency and Slow DNA Replication in Mitochondria. *PLoS genetics* *12*, e1005779.
173. Antonenkov, V.D., Isomursu, A., Mennerich, D., Vapola, M.H., Weiher, H., Kietzmann, T., and Hiltunen, J.K. (2015). The Human Mitochondrial DNA Depletion Syndrome Gene MPV17 Encodes a Non-selective Channel That Modulates Membrane Potential. *The Journal of biological chemistry* *290*, 13840-13861.
174. Lollgen, S., and Weiher, H. (2015). The role of the Mpv17 protein mutations of which cause mitochondrial DNA depletion syndrome (MDDS): lessons from homologs in different species. *Biological chemistry* *396*, 13-25.
175. Spinazzola, A., Viscomi, C., Fernandez-Vizarra, E., Carrara, F., D'Adamo, P., Calvo, S., Marsano, R.M., Donnini, C., Weiher, H., Strisciuglio, P., et al. (2006). MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nature genetics* *38*, 570-575.
176. Blakely, E.L., Butterworth, A., Hadden, R.D., Bodi, I., He, L., McFarland, R., and Taylor, R.W. (2012). MPV17 mutation causes neuropathy and leukoencephalopathy with multiple mtDNA deletions in muscle. *Neuromuscular disorders : NMD* *22*, 587-591.
177. Garone, C., Rubio, J.C., Calvo, S.E., Naini, A., Tanji, K., Dimauro, S., Mootha, V.K., and Hirano, M. (2012). MPV17 Mutations Causing Adult-Onset Multisystemic Disorder With Multiple Mitochondrial DNA Deletions. *Archives of neurology* *69*, 1648-1651.
178. Di Fonzo, A., Ronchi, D., Lodi, T., Fassone, E., Tigano, M., Lamperti, C., Corti, S., Bordoni, A., Fortunato, F., Nizzardo, M., et al. (2009). The mitochondrial disulfide relay system protein GFER is mutated in autosomal-recessive myopathy with cataract and combined respiratory-chain deficiency. *American journal of human genetics* *84*, 594-604.

179. Ostergaard, E., Christensen, E., Kristensen, E., Mogensen, B., Duno, M., Shoubbridge, E.A., and Wibrand, F. (2007). Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *American journal of human genetics* *81*, 383-387.
180. Elpeleg, O., Miller, C., Hershkovitz, E., Bitner-Glindzicz, M., Bondi-Rubinstein, G., Rahman, S., Pagnamenta, A., Eshhar, S., and Saada, A. (2005). Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *American journal of human genetics* *76*, 1081-1086.
181. Gorman, G.S., Pfeffer, G., Griffin, H., Blakely, E.L., Kurzawa-Akanbi, M., Gabriel, J., Sitarz, K., Roberts, M., Schoser, B., Pyle, A., et al. (2015). Clonal expansion of secondary mitochondrial DNA deletions associated with spinocerebellar ataxia type 28. *JAMA neurology* *72*, 106-111.
182. Wedding, I.M., Koht, J., Tran, G.T., Misceo, D., Selmer, K.K., Holmgren, A., Frengen, E., Bindoff, L., Tallaksen, C.M., and Tzoulis, C. (2014). Spastic paraplegia type 7 is associated with multiple mitochondrial DNA deletions. *PloS one* *9*, e86340.
183. Bulst, S., Abicht, A., Holinski-Feder, E., Muller-Ziermann, S., Koehler, U., Thirion, C., Walter, M.C., Stewart, J.D., Chinnery, P.F., Lochmuller, H., et al. (2009). In vitro supplementation with dAMP/dGMP leads to partial restoration of mtDNA levels in mitochondrial depletion syndromes. *Human molecular genetics* *18*, 1590-1599.
184. Bulst, S., Holinski-Feder, E., Payne, B., Abicht, A., Krause, S., Lochmuller, H., Chinnery, P.F., Walter, M.C., and Horvath, R. (2012). In vitro supplementation with deoxynucleoside monophosphates rescues mitochondrial DNA depletion. *Molecular genetics and metabolism* *107*, 95-103.
185. Buchaklian, A.H., Helbling, D., Ware, S.M., and Dimmock, D.P. (2012). Recessive deoxyguanosine kinase deficiency causes juvenile onset mitochondrial myopathy. *Molecular genetics and metabolism* *107*, 92-94.
186. Taanman, J.W., Muddle, J.R., and Muntau, A.C. (2003). Mitochondrial DNA depletion can be prevented by dGMP and dAMP supplementation in a resting culture of deoxyguanosine kinase-deficient fibroblasts. *Human molecular genetics* *12*, 1839-1845.
187. Stewart, J.D., Schoeler, S., Sitarz, K.S., Horvath, R., Hallmann, K., Pyle, A., Yu-Wai-Man, P., Taylor, R.W., Samuels, D.C., Kunz, W.S., et al. (2011). POLG mutations cause decreased mitochondrial DNA repopulation rates following induced depletion in human fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* *1812*, 321-325.
188. Pontarin, G., Ferraro, P., Bee, L., Reichard, P., and Bianchi, V. (2012). Mammalian ribonucleotide reductase subunit p53R2 is required for mitochondrial DNA replication and DNA repair in quiescent cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 13302-13307.
189. Haroon, S., Li, A., Weinert, J.L., Fritsch, C., Ericson, N.G., Alexander-Floyd, J., Braeckman, B.P., Haynes, C.M., Bielas, J.H., Gidalevitz, T., et al. (2018). Multiple Molecular Mechanisms Rescue mtDNA Disease in *C. elegans*. *Cell reports* *22*, 3115-3125.
190. Rahn, J.J., Bestman, J.E., Stackley, K.D., and Chan, S.S. (2015). Zebrafish lacking functional DNA polymerase gamma survive to juvenile stage, despite rapid and sustained mitochondrial DNA depletion, altered energetics and growth. *Nucleic acids research* *43*, 10338-10352.
191. D'Agati, G., Beltre, R., Sessa, A., Burger, A., Zhou, Y., Mosimann, C., and White, R.M. (2017). A defect in the mitochondrial protein Mpv17 underlies the transparent casper zebrafish. *Developmental biology* *430*, 11-17.
192. Krauss, J., Astrinidis, P., Astrinides, P., Frohnhofer, H.G., Walderich, B., and Nusslein-Volhard, C. (2013). transparent, a gene affecting stripe formation in Zebrafish, encodes the mitochondrial protein Mpv17 that is required for iridophore survival. *Biology open* *2*, 703-710.

193. Munro, B., Horvath, R., and Muller, J.S. (2019). Nucleoside supplementation modulates mitochondrial DNA copy number in the *dguok* ^{-/-} zebrafish. *Human molecular genetics* **28**, 796-803.
194. Bennett, B., Helbling, D., Meng, H., Jarzembowski, J., Geurts, A.M., Friederich, M.W., Van Hove, J.L.K., Lawlor, M.W., and Dimmock, D.P. (2016). Potentially diagnostic electron paramagnetic resonance spectra elucidate the underlying mechanism of mitochondrial dysfunction in the deoxyguanosine kinase deficient rat model of a genetic mitochondrial DNA depletion syndrome. *Free radical biology & medicine* **92**, 141-151.
195. Tynismaa, H., and Suomalainen, A. (2010). Mouse models of mtDNA replication diseases. *Methods* **51**, 405-410.
196. Weiher, H., Noda, T., Gray, D.A., Sharpe, A.H., and Jaenisch, R. (1990). Transgenic mouse model of kidney disease: insertional inactivation of ubiquitously expressed gene leads to nephrotic syndrome. *Cell* **62**, 425-434.
197. Graham, B.H., Waymire, K.G., Cottrell, B., Trounce, I.A., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (1997). A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nature genetics* **16**, 226-234.
198. Kimura, T., Takeda, S., Sagiya, Y., Gotoh, M., Nakamura, Y., and Arakawa, H. (2003). Impaired function of p53R2 in *Rrm2b*-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools. *Nature genetics* **34**, 440-445.
199. Cerritelli, S.M., Frolova, E.G., Feng, C., Grinberg, A., Love, P.E., and Crouch, R.J. (2003). Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in *Rnaseh1* null mice. *Molecular cell* **11**, 807-815.
200. Hance, N., Ekstrand, M.I., and Trifunovic, A. (2005). Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Human molecular genetics* **14**, 1775-1783.
201. Tynismaa, H., Mjosund, K.P., Wanrooij, S., Lappalainen, I., Ylikallio, E., Jalanko, A., Spelbrink, J.N., Paetau, A., and Suomalainen, A. (2005). Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 17687-17692.
202. Alavi, M.V., Bette, S., Schimpf, S., Schuettauf, F., Schraermeyer, U., Wehrl, H.F., Ruttiger, L., Beck, S.C., Tonagel, F., Pichler, B.J., et al. (2007). A splice site mutation in the murine *Opa1* gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain : a journal of neurology* **130**, 1029-1042.
203. Lewis, W., Day, B.J., Kohler, J.J., Hosseini, S.H., Chan, S.S., Green, E.C., Haase, C.P., Keebaugh, E.S., Long, R., Ludaway, T., et al. (2007). Decreased mtDNA, oxidative stress, cardiomyopathy, and death from transgenic cardiac targeted human mutant polymerase gamma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **87**, 326-335.
204. Zhou, X., Solaroli, N., Bjerke, M., Stewart, J.B., Rozell, B., Johansson, M., and Karlsson, A. (2008). Progressive loss of mitochondrial DNA in thymidine kinase 2-deficient mice. *Human molecular genetics* **17**, 2329-2335.
205. Akman, H.O., Dorado, B., Lopez, L.C., Garcia-Cazorla, A., Vila, M.R., Tanabe, L.M., Dauer, W.T., Bonilla, E., Tanji, K., and Hirano, M. (2008). Thymidine kinase 2 (H126N) knockin mice show the essential role of balanced deoxynucleotide pools for mitochondrial DNA maintenance. *Human molecular genetics* **17**, 2433-2440.
206. Lopez, L.C., Akman, H.O., Garcia-Cazorla, A., Dorado, B., Marti, R., Nishino, I., Tadesse, S., Pizzorno, G., Shungu, D., Bonilla, E., et al. (2009). Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Human molecular genetics* **18**, 714-722.

207. Humble, M.M., Young, M.J., Foley, J.F., Pandiri, A.R., Travlos, G.S., and Copeland, W.C. (2013). Polg2 is essential for mammalian embryogenesis and is required for mtDNA maintenance. *Human molecular genetics* 22, 1017-1025.
208. Nikkanen, J., Forsstrom, S., Euro, L., Paetau, I., Kohnz, R.A., Wang, L., Chilov, D., Viinamaki, J., Roivainen, A., Marjamaki, P., et al. (2016). Mitochondrial DNA Replication Defects Disturb Cellular dNTP Pools and Remodel One-Carbon Metabolism. *Cell metabolism* 23, 635-648.
209. Matic, S., Jiang, M., Nicholls, T.J., Uhler, J.P., Dirksen-Schwanenland, C., Polosa, P.L., Simard, M.L., Li, X., Atanassov, I., Rackham, O., et al. (2018). Mice lacking the mitochondrial exonuclease MGME1 accumulate mtDNA deletions without developing progeria. *Nature communications* 9, 1202.
210. Zhou, X., Curbo, S., Zhao, Q., Krishnan, S., Kuiper, R., and Karlsson, A. (2019). Severe mtDNA depletion and dependency on catabolic lipid metabolism in DGUOK knockout mice. *Human molecular genetics*.
211. Tynismaa, H., and Suomalainen, A. (2009). Mouse models of mitochondrial DNA defects and their relevance for human disease. *EMBO reports* 10, 137-143.
212. El-Hattab, A.W., Zarante, A.M., Almannai, M., and Scaglia, F. (2017). Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Molecular genetics and metabolism* 122, 1-9.
213. Hirano, M., Emmanuele, V., and Quinzii, C.M. (2018). Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays in biochemistry* 62, 467-481.
214. De Giorgio, R., Pironi, L., Rinaldi, R., Boschetti, E., Caporali, L., Capristo, M., Casali, C., Cenacchi, G., Contin, M., D'Angelo, R., et al. (2016). Liver transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Annals of neurology* 80, 448-455.
215. Parikh, S., Karaa, A., Goldstein, A., Ng, Y.S., Gorman, G., Feigenbaum, A., Christodoulou, J., Haas, R., Tarnopolsky, M., Cohen, B.K., et al. (2016). Solid organ transplantation in primary mitochondrial disease: Proceed with caution. *Molecular genetics and metabolism* 118, 178-184.
216. Roeben, B., Marquetand, J., Bender, B., Billing, H., Haack, T.B., Sanchez-Albisua, I., Schols, L., Blom, H.J., and Synofzik, M. (2017). Hemodialysis in MNGIE transiently reduces serum and urine levels of thymidine and deoxyuridine, but not CSF levels and neurological function. *Orphanet journal of rare diseases* 12, 135.
217. Halter, J.P., Michael, W., Schupbach, M., Mandel, H., Casali, C., Orchard, K., Collin, M., Valcarcel, D., Rovelli, A., Filosto, M., et al. (2015). Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain : a journal of neurology* 138, 2847-2858.
218. Baker, M.K., Schutte, C.M., Ranchhod, N., Brittain, D., and van Rensburg, J.E. (2017). Transient clinical improvement of a mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy-like syndrome after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *BMJ case reports* 2017.
219. Levene, M., Bain, M.D., Moran, N.F., Nirmalanathan, N., Poulton, J., Scarpelli, M., Filosto, M., Mandel, H., MacKinnon, A.D., Fairbanks, L., et al. (2019). Safety and Efficacy of Erythrocyte Encapsulated Thymidine Phosphorylase in Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Journal of clinical medicine* 8.
220. Bax, B.E., Levene, M., Bain, M.D., Fairbanks, L.D., Filosto, M., Kalkan Ucar, S., Klopstock, T., Kornblum, C., Mandel, H., Rahman, S., et al. (2019). Erythrocyte Encapsulated Thymidine Phosphorylase for the Treatment of Patients with Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy: Study Protocol for a Multi-Centre, Multiple Dose, Open Label Trial. *Journal of clinical medicine* 8.

221. Cabrera-Perez, R., Vila-Julia, F., Hirano, M., Mingozi, F., Torres-Torronteras, J., and Marti, R. (2019). The Alpha-1-Antitrypsin Promoter Improves the Efficacy of an AAV Vector for the Treatment of MNGIE. *Human gene therapy*.
222. Bottani, E., Giordano, C., Civiletto, G., Di Meo, I., Auricchio, A., Ciusani, E., Marchet, S., Lamperti, C., d'Amati, G., Viscomi, C., et al. (2014). AAV-mediated liver-specific MPV17 expression restores mtDNA levels and prevents diet-induced liver failure. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 22, 10-17.
223. Camara, Y., Gonzalez-Vioque, E., Scarpelli, M., Torres-Torronteras, J., Caballero, A., Hirano, M., and Marti, R. (2014). Administration of deoxyribonucleosides or inhibition of their catabolism as a pharmacological approach for mitochondrial DNA depletion syndrome. *Human molecular genetics* 23, 2459-2467.
224. Saada, A. (2008). Mitochondrial deoxyribonucleotide pools in deoxyguanosine kinase deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 95, 169-173.
225. Garone, C., Taylor, R.W., Nascimento, A., Poulton, J., Fratter, C., Dominguez-Gonzalez, C., Evans, J.C., Loos, M., Isohanni, P., Suomalainen, A., et al. (2018). Retrospective natural history of thymidine kinase 2 deficiency. *Journal of medical genetics* 55, 515-521.
226. Camara, Y., Carreno-Gago, L., Martin, M.A., Melia, M.J., Blazquez, A., Delmiro, A., Garrabou, G., Moren, C., Diaz-Manera, J., Gallardo, E., et al. (2015). Severe TK2 enzyme activity deficiency in patients with mild forms of myopathy. *Neurology* 84, 2286-2288.
227. Krishnan, S., Zhou, X., Paredes, J.A., Kuiper, R.V., Curbo, S., and Karlsson, A. (2013). Transgene expression of *Drosophila melanogaster* nucleoside kinase reverses mitochondrial thymidine kinase 2 deficiency. *The Journal of biological chemistry* 288, 5072-5079.
228. Krishnan, S., Paredes, J.A., Zhou, X., Kuiper, R.V., Hultenby, K., Curbo, S., and Karlsson, A. (2014). Long term expression of *Drosophila melanogaster* nucleoside kinase in thymidine kinase 2-deficient mice with no lethal effects caused by nucleotide pool imbalances. *The Journal of biological chemistry* 289, 32835-32844.
229. Garone, C., Garcia-Diaz, B., Emmanuele, V., Lopez, L.C., Tadesse, S., Akman, H.O., Tanji, K., Quinzii, C.M., and Hirano, M. (2014). Deoxypyrimidine monophosphate bypass therapy for thymidine kinase 2 deficiency. *EMBO molecular medicine* 6, 1016-1027.
230. Lopez-Gomez, C., Levy, R.J., Sanchez-Quintero, M.J., Juanola-Falgarona, M., Barca, E., Garcia-Diaz, B., Tadesse, S., Garone, C., and Hirano, M. (2017). Deoxycytidine and Deoxythymidine Treatment for Thymidine Kinase 2 Deficiency. *Annals of neurology* 81, 641-652.
231. Blazquez-Bermejo, C., Molina-Granada, D., Vila-Julia, F., Jimenez-Heis, D., Zhou, X., Torres-Torronteras, J., Karlsson, A., Marti, R., and Camara, Y. (2019). Age-related metabolic changes limit efficacy of deoxynucleoside-based therapy in thymidine kinase 2-deficient mice. *EBioMedicine*.
232. Lopez-Gomez, C., Hewan, H., Sierra, C., Akman, H.O., Sanchez-Quintero, M.J., Juanola-Falgarona, M., Tadesse, S., Tanji, K., Konofagou, E.E., and Hirano, M. (2019). Bioavailability and cytosolic kinases modulate response to deoxynucleoside therapy in TK2 deficiency. *EBioMedicine*.
233. Dominguez-Gonzalez, C., Madruga-Garrido, M., Mavillard, F., Garone, C., Aguirre-Rodriguez, F.J., Donati, M.A., Kleinstaub, K., Marti, I., Martin-Hernandez, E., Morealejo-Aycinena, J.P., et al. (2019). Deoxynucleoside Therapy for Thymidine Kinase 2-Deficient Myopathy. *Annals of neurology* 86, 293-303.
234. Woodbridge, P., Liang, C., Davis, R.L., Vandebona, H., and Sue, C.M. (2013). POLG mutations in Australian patients with mitochondrial disease. *Internal medicine journal* 43, 150-156.
235. Rahman, S., and Copeland, W.C. (2019). POLG-related disorders and their neurological manifestations. *Nature reviews. Neurology* 15, 40-52.

236. Nurminen, A., Farnum, G.A., and Kaguni, L.S. (2017). Pathogenicity in POLG syndromes: DNA polymerase gamma pathogenicity prediction server and database. *BBA clinical* 7, 147-156.
237. Meyer, J.N., Leung, M.C., Rooney, J.P., Sendoel, A., Hengartner, M.O., Kisby, G.E., and Bess, A.S. (2013). Mitochondria as a target of environmental toxicants. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 134, 1-17.
238. Uusimaa, J., Gowda, V., McShane, A., Smith, C., Evans, J., Shrier, A., Narasimhan, M., O'Rourke, A., Rajabally, Y., Hedderly, T., et al. (2013). Prospective study of POLG mutations presenting in children with intractable epilepsy: prevalence and clinical features. *Epilepsia* 54, 1002-1011.
239. Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417-423.
240. Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., et al. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481-484.
241. Amiot, A., Tchikviladze, M., Joly, F., Slama, A., Hatem, D.C., Jardel, C., Messing, B., and Lombes, A. (2009). Frequency of mitochondrial defects in patients with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gastroenterology* 137, 101-109.
242. Copeland, W.C. (2008). Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annual review of medicine* 59, 131-146.
243. Bortot, B., Barbi, E., Biffi, S., Lunazzi, G., Bussani, R., Burlina, A., Norbedo, S., Ventura, A., Carrozzi, M., and Severini, G.M. (2009). Two novel POLG mutations causing hepatic mitochondrial DNA depletion with recurrent hypoketotic hypoglycaemia and fatal liver dysfunction. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 41, 494-499.
244. Nishigaki, Y., Marti, R., and Hirano, M. (2004). ND5 is a hot-spot for multiple atypical mitochondrial DNA deletions in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Human molecular genetics* 13, 91-101.
245. Walker, U.A., Auclair, M., Lebrecht, D., Kornprobst, M., Capeau, J., and Caron, M. (2006). Uridine abrogates the adverse effects of antiretroviral pyrimidine analogues on adipose cell functions. *Antiviral therapy* 11, 25-34.
246. Marti, R., Lopez, L.C., and Hirano, M. (2012). Assessment of thymidine phosphorylase function: measurement of plasma thymidine (and deoxyuridine) and thymidine phosphorylase activity. *Methods in molecular biology* 837, 121-133.
247. Laconi, E., Denda, A., Rao, P.M., Rajalakshmi, S., Pani, P., and Sarma, D.S. (1993). Studies on liver tumor promotion in the rat by orotic acid: dose and minimum exposure time required for dietary orotic acid to promote hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 14, 1771-1775.
248. Dorado, B., Area, E., Akman, H.O., and Hirano, M. (2011). Onset and organ specificity of Tk2 deficiency depends on Tk1 down-regulation and transcriptional compensation. *Human molecular genetics* 20, 155-164.
249. Wang, L., Saada, A., and Eriksson, S. (2003). Kinetic properties of mutant human thymidine kinase 2 suggest a mechanism for mitochondrial DNA depletion myopathy. *The Journal of biological chemistry* 278, 6963-6968.
250. Ferraro, P., Nicolosi, L., Bernardi, P., Reichard, P., and Bianchi, V. (2006). Mitochondrial deoxynucleotide pool sizes in mouse liver and evidence for a transport mechanism for thymidine monophosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18586-18591.
251. Huang, W., Zeng, X., Shi, Y., and Liu, M. (2017). Functional characterization of human equilibrative nucleoside transporter 1. *Protein & cell* 8, 284-295.

252. Lenz, H.J., Stintzing, S., and Loupakis, F. (2015). TAS-102, a novel antitumor agent: a review of the mechanism of action. *Cancer treatment reviews* *41*, 777-783.
253. Lee, J.J., and Chu, E. (2017). Adherence, Dosing, and Managing Toxicities With Trifluridine/Tipiracil (TAS-102). *Clinical colorectal cancer* *16*, 85-92.
254. Fukushima, M., Suzuki, N., Emura, T., Yano, S., Kazuno, H., Tada, Y., Yamada, Y., and Asao, T. (2000). Structure and activity of specific inhibitors of thymidine phosphorylase to potentiate the function of antitumor 2'-deoxyribonucleosides. *Biochemical pharmacology* *59*, 1227-1236.
255. Molokie, R., Lavelle, D., Gowhari, M., Pacini, M., Krauz, L., Hassan, J., Ibanez, V., Ruiz, M.A., Ng, K.P., Woost, P., et al. (2017). Oral tetrahydrouridine and decitabine for non-cytotoxic epigenetic gene regulation in sickle cell disease: A randomized phase 1 study. *PLoS medicine* *14*, e1002382.
256. Morfouace, M., Nimmervoll, B., Boulos, N., Patel, Y.T., Shelat, A., Freeman, B.B., 3rd, Robinson, G.W., Wright, K., Gajjar, A., Stewart, C.F., et al. (2016). Preclinical studies of 5-fluoro-2'-deoxycytidine and tetrahydrouridine in pediatric brain tumors. *Journal of neuro-oncology* *126*, 225-234.
257. Beumer, J.H., Eiseman, J.L., Parise, R.A., Joseph, E., Covey, J.M., and Egorin, M.J. (2008). Modulation of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine) pharmacokinetics, metabolism, and bioavailability in mice by 3,4,5,6-tetrahydrouridine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *14*, 3529-3535.
258. Lara, M.C., Valentino, M.L., Torres-Torronteras, J., Hirano, M., and Marti, R. (2007). Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): biochemical features and therapeutic approaches. *Bioscience reports* *27*, 151-163.
259. Martorano, L., Peron, M., Laquatra, C., Lidron, E., Facchinello, N., Meneghetti, G., Tiso, N., Rasola, A., Ghezzi, D., and Argenton, F. (2019). The zebrafish orthologue of the human hepatocerebral disease gene MPV17 plays pleiotropic roles in mitochondria. *Disease models & mechanisms* *12*.
260. Ahlqvist, K.J., Hamalainen, R.H., Yatsuga, S., Uutela, M., Terzioglu, M., Gotz, A., Forsstrom, S., Salven, P., Angers-Loustau, A., Kopra, O.H., et al. (2012). Somatic progenitor cell vulnerability to mitochondrial DNA mutagenesis underlies progeroid phenotypes in Polg mutator mice. *Cell metabolism* *15*, 100-109.
261. Snyder, R.D. (1988). Consequences of the depletion of cellular deoxynucleoside triphosphate pools on the excision-repair process in cultured human fibroblasts. *Mutation research* *200*, 193-199.
262. Buckland, R.J., Watt, D.L., Chittoor, B., Nilsson, A.K., Kunkel, T.A., and Chabes, A. (2014). Increased and imbalanced dNTP pools symmetrically promote both leading and lagging strand replication infidelity. *PLoS genetics* *10*, e1004846.
263. Yao, N.Y., Schroeder, J.W., Yurieva, O., Simmons, L.A., and O'Donnell, M.E. (2013). Cost of rNTP/dNTP pool imbalance at the replication fork. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 12942-12947.
264. Kempin, S., Sun, Z., Kay, N.E., Paietta, E.M., Mazza, J.J., Ketterling, R.P., Frankfurt, O., Claxton, D.F., Saltzman, J.N., Srkalovic, G., et al. (2019). Pentostatin, Cyclophosphamide, and Rituximab Followed by Alemtuzumab for Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: A Phase 2 Trial of the ECOG-Acrin Cancer Research Group (E2903). *Acta haematologica*, 1-9.
265. Kay, N.E., LaPlant, B.R., Pettinger, A.M., Call, T.G., Leis, J.F., Ding, W., Parikh, S.A., Conte, M.J., Bowen, D.A., and Shanafelt, T.D. (2018). Cumulative experience and long term follow-up of pentostatin-based chemoimmunotherapy trials for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Expert review of hematology* *11*, 337-349.

266. Korycka, A., Blonski, J.Z., and Robak, T. (2007). Forodesine (BCX-1777, Immucillin H)--a new purine nucleoside analogue: mechanism of action and potential clinical application. *Mini reviews in medicinal chemistry* 7, 976-983.
267. Jiang, M., Kauppila, T.E.S., Motori, E., Li, X., Atanassov, I., Folz-Donahue, K., Bonekamp, N.A., Albarran-Gutierrez, S., Stewart, J.B., and Larsson, N.G. (2017). Increased Total mtDNA Copy Number Cures Male Infertility Despite Unaltered mtDNA Mutation Load. *Cell metabolism* 26, 429-436 e424.
268. Bianco, A., Bisceglia, L., Russo, L., Palese, L.L., D'Agruma, L., Emperador, S., Montoya, J., Guerriero, S., and Petruzzella, V. (2017). High Mitochondrial DNA Copy Number Is a Protective Factor From Vision Loss in Heteroplasmic Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON). *Investigative ophthalmology & visual science* 58, 2193-2197.
269. Ruiz-Pesini, E., Emperador, S., Lopez-Gallardo, E., Hernandez-Ainsa, C., and Montoya, J. (2018). Increasing mtDNA levels as therapy for mitochondrial optic neuropathies. *Drug discovery today* 23, 493-498.
270. Kaufmann, K.B., Buning, H., Galy, A., Schambach, A., and Grez, M. (2013). Gene therapy on the move. *EMBO molecular medicine* 5, 1642-1661.

ANEXO

Propiedad intelectual derivada de este trabajo

Título patente registrada: TREATMENT OF MITOCHONDRIAL DISEASES

Inventores/autores: Yolanda Cámara; Ramon Martí; Emiliano González-Vioque; Cora Blázquez-Bermejo; Javier Torres-Torronteras; Raquel Cabrera

Entidades depositarias: VHIR-CIBERER

Nº registro: P15170825.2

País inscripción: España

Fecha del registro: 05/06/2015

Estado: Licenciada en diciembre de 2017 a Modis Therapeutics

Título patente registrada: METHOD OF INCREASING MITOCHONDRIAL DNA COPY NUMBER

Inventores/autores: Yolanda Cámara; Ramon Martí; Cora Blázquez-Bermejo

Entidades depositarias: VHIR-CIBERER

Nº registro: EP19382494.3

País inscripción: España

Fecha del registro: 13/06/2019

Estado: registrada