



UCAM HiTech
SPORT & HEALTH INNOVATION HUB

El grupo de investigación de **Metabolismo y Regulación Génica de Enfermedades (MGD)**, dirigido por los doctores Rubén Rabadán y Rubén Zapata, es parte del laboratorio Juan Carlos Izpisua Belmonte de UCAM Hitech, Sport & Health Innovation Hub, un entorno único para la investigación de alto nivel y el emprendimiento en la Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM). Nace con el objetivo de buscar nuevas terapias y biomarcadores de enfermedades, así como estudiar los mecanismos que subyacen estas enfermedades.

El grupo MGD estudia la regulación de enfermedades en un contexto amplio, abarcando desde enfermedades hereditarias hasta aquellas relacionadas con el envejecimiento. Además, tiene gran interés en los procesos metabólicos que subyacen a estas enfermedades y a otras derivadas de fallos en el propio metabolismo, así como su regulación génica y la aplicación de técnicas de edición génica (ej: CRISPR/Cas9) para su tratamiento.

NOMBRE DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL: RUBÉN RABADÁN ROS

TÍTULO DEL PROYECTO

DESARROLLO DE TERAPIAS ALTERNATIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DEFICIENCIA COMBINADA DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA TIPO 1 (COXPD1) CAUSADA POR MUTACIONES EN *GFM1*

RESUMEN (250 palabras)

Las enfermedades mitocondriales se caracterizan por un defecto en la producción de energía celular, provocando una variedad de síntomas tales como crecimiento deficiente, problemas neuronales, o enfermedades hepáticas y cardíacas, entre otros. Pese a que están clasificadas como enfermedades raras, representan la segunda enfermedad genética grave más comúnmente diagnosticada, tras la fibrosis quística. Además, las deficiencias mitocondriales están asociadas a otras enfermedades como Alzheimer, Parkinson y diabetes, resaltando su importancia. Actualmente, la ausencia de tratamiento hace que los afectados por estas enfermedades dependan de los avances médicos y farmacológicos, completamente ligados a la investigación.

Una de estas enfermedades mitocondriales es la hepatoencefalopatía causada por una deficiencia combinada de fosforilación oxidativa (OXPHOS) tipo 1 (COXPD1); provocada por mutaciones en el gen nuclear *GFM1* que codifica el factor de elongación mitocondrial G1. La COXPD1 se manifiesta desde una edad muy temprana con hipo e hipertonia muscular, retraso del desarrollo, convulsiones, polineuropatía, microcefalia y rasgos dismórficos menores. Los rasgos neurorradiológicos más comunes incluyen estrechamiento del cuerpo calloso, leucodistrofia y afectación del ganglio basal. Es una enfermedad infantil que progresa de forma muy rápida, donde los pacientes suelen morir durante los primeros meses de vida.

En este proyecto, proponemos el uso de vía farmacológica basada en la administración de compuestos potenciadores de la fosforilación oxidativa. Este proyecto podría ayudar al avance en el tratamiento de otras enfermedades mitocondriales.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias son orgánulos que desempeñan un papel único y fundamental en la producción de energía en la célula. Así, estos orgánulos se encargan de la respiración celular, también llamada fosforilación oxidativa (OXPHOS), cuya finalidad es la producción de ATP, una molécula necesaria para el mantenimiento de la función celular. Es por ello que, cuando hay un fallo a nivel mitocondrial, la cantidad de energía dentro de las células disminuye severamente. Por tanto, las enfermedades mitocondriales se caracterizan por un defecto en la producción de energía dentro de las células del organismo. Estas enfermedades pueden aparecer a cualquier edad, aunque son más comunes en la infancia, y afectar a cualquier órgano y sistema del cuerpo, presentando una variedad de síntomas tales como debilidad muscular, crecimiento deficiente, problemas de aprendizaje, problemas neuronales, o enfermedades hepáticas y cardíacas, entre otras ¹.

Las enfermedades mitocondriales están clasificadas como enfermedades raras, poco frecuentes o de baja prevalencia, (con una incidencia en la población de 1 de cada 5.000 habitantes). Sin embargo, los trastornos mitocondriales se sitúan en segunda posición en enfermedades genéticas graves más comúnmente diagnosticadas, tras la fibrosis quística. Es más; las investigaciones han revelado distintas asociaciones entre la disfunción mitocondrial y otras enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson, la diabetes, y algunos tipos de cáncer²⁻⁵.

Una de estas enfermedades mitocondriales es la hepatoencefalopatía causada por deficiencia combinada de fosforilación oxidativa (OXPHOS) tipo 1 (COXPD1) (OMIM#609060); una enfermedad causada por mutaciones en el gen nuclear *GFM1* que codifica el factor de elongación mitocondrial G1 (EFG1) (figura 1)⁶. La COXPD1 se manifiesta desde una edad muy temprana con hipo e hipertonia muscular, retraso del desarrollo, convulsiones, polineuropatía, microcefalia y rasgos dismórficos menores. Los rasgos neurorradiológicos más comunes incluyen estrechamiento del cuerpo caloso, leucodistrofia y afectación del ganglio basal. Es una enfermedad infantil ultra-rara que solamente cuenta con 32 casos descritos en la literatura, además de dos casos adicionales recientemente descritos en España (datos no publicados). La enfermedad progresa rápidamente y los pacientes mueren durante los primeros meses de vida, aunque se han reportado algunos casos de pacientes cuya supervivencia es superior.

Hasta el momento, el estudio de COXPD1 se basaba en el uso de fibroblastos como modelo, resultando muy útil para el diagnóstico y caracterización fisiopatológica de los pacientes con COXPD1. Sin embargo, el uso de fibroblastos presenta ciertas limitaciones para el desarrollo de potenciales terapias, ya que no manifiestan ampliamente el fenotipo de la enfermedad⁷. Por el contrario, la aparición de tecnologías que permiten la generación de células pluripotentes inducidas (iPSCs), consideradas como los modelos celulares más útiles para desarrollar aproximaciones terapéuticas debido a su capacidad para diferenciarse en distintos tipos celulares⁸, y el reciente desarrollo por parte del grupo dirigido por el Dr. Javier Torres Torronteras (Institut De Recerca Hospital Universitari Vall D'hebron) de un modelo animal de ratón knock-in (KI) *Gfm1*^{R671C} portador de la mutación puntual en el gen *Gfm1*⁹, hacen posible la búsqueda y desarrollo de nuevas terapias para la enfermedad COXPD1.

Las enfermedades mitocondriales son genéticas, crónicas, degenerativas y altamente discapacitantes, y hasta el momento no tienen cura. Todos los afectados por estas enfermedades dependen de los avances médicos y farmacológicos, que están completamente ligados a la investigación en este campo. Por otro lado, esta enfermedad y las estrategias terapéuticas a seguir pueden servir como modelo para el desarrollo de terapias para otras enfermedades raras congénitas con afectación mitocondrial. Es por ello que, en este proyecto, proponemos el empleo de compuestos con efecto potenciador de la fosforilación oxidativa, tales como potenciadores de NAD⁺ y moduladores redox.

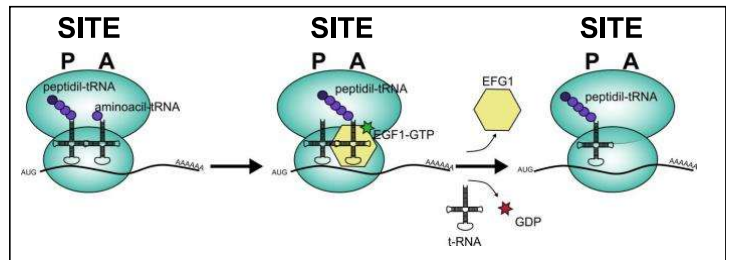


Figura 1. EFG1 cataliza la translocación de peptidil tRNA desde el sitio aminoacilo del aceptor ribosómico al sitio peptídico después de la formación del enlace peptídico.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo 1. Determinar la eficacia de una terapia combinatoria con precursores de NAD⁺ y moduladores redox

Resultados previos

Pese al prometedor futuro de la edición génica basada en CRISPR/Cas9, estas técnicas todavía no han sido aplicadas en la clínica, habiendo sido aprobado el primer ensayo clínico por la FDA en marzo de 2021. Asimismo, se trata de terapias con un alto coste, con el consiguiente impacto económico en los sistemas de salud y pudiendo quedar lejos del alcance de toda la población hasta que se extienda su uso. Así, ante la falta de un tratamiento eficaz para las enfermedades mitocondriales, es necesario explorar también nuevas vías farmacológicas que actúen a nivel mitocondrial.

Curiosamente, la disminución de los niveles celulares de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), un metabolito esencial para la generación de ATP en la mitocondria por estar implicado en la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones, está íntimamente relacionada con anomalías mitocondriales, que en la mayoría de los casos conducen a este tipo de trastornos mitocondriales¹⁰. Por ejemplo, las deleciones en el ADN mitocondrial provocan la aparición de miopatía mitocondrial en adultos, una enfermedad caracterizada por debilidad muscular generalizada y fatiga por agotamiento sistémico de NAD⁺. Otro ejemplo de enfermedad mitocondrial relacionada con una disminución severa de los niveles de NAD⁺ es el síndrome de Leigh, una causada por mutaciones en los genes que codifican proteínas mitocondriales, y para las cuales no hay tratamiento disponible.

¿Es posible utilizar precursores de NAD⁺ y moduladores de la cadena de transporte de electrones para el tratamiento de la enfermedad mitocondrial COXPD1?

Sorprendentemente, la administración de los precursores de NAD⁺ ha demostrado su eficacia para aliviar los resultados de trastornos como el síndrome de Leigh o la miopatía mitocondrial¹¹. De hecho, nuestro grupo ha demostrado que la suplementación con nicotinamida ribósido (NR), un precursor de NAD⁺, es capaz de restaurar el fenotipo en un modelo de *Drosophila* de Síndrome de Barth, una enfermedad mitocondrial hereditaria caracterizada por agotamiento intenso y cardiomiopatía¹². Por tanto, las estrategias de reposición de NAD⁺ han surgido como vías terapéuticas prometedoras para el tratamiento de la enfermedad mitocondrial.

Además de los precursores de NAD⁺, otra aproximación al tratamiento de enfermedades mitocondriales es el empleo de otros moduladores de la cadena de transporte mitocondrial. Entre estos fármacos, el compuesto KH176 (Khondrion BV, Países Bajos) ha mostrado resultados muy prometedores en un modelo de ratón de la enfermedad de Leigh¹³.

Sin embargo, ni el uso de precursores de NAD⁺ ni de otros compuestos moduladores de la cadena de transporte de electrones han sido probados en el contexto de COXPD1. Asimismo, a pesar de que ambos tipos de compuestos tienen efecto sobre las mitocondrias, hasta ahora no se ha probado en ningún escenario una terapia combinatoria con potenciadores de NAD⁺ y moduladores redox a fin de estimular a la cadena de transporte mitocondrial.

Este proyecto explorará, por primera vez, la eficacia de combinar precursores de NAD⁺ con el modulador redox KH176 en modelos hiPSC de COXPD1. Después de la preselección utilizando estos modelos *in vitro*, la terapia más favorable se traducirá a un modelo de ratón COXPD1.

METODOLOGÍA

Objetivo 1. Determinar la eficacia de una terapia combinatoria con precursores de NAD⁺ y moduladores redox

Tarea 1.1. Evaluación *in vitro* de la eficacia de precursores NAD⁺ y moduladores redox para COXPD1

Evaluaremos el efecto de distintos precursores de NAD⁺ (NMN y NR), solos o en combinación con el modulador de la cadena de transporte de electrones KH176, sobre neuronas derivadas de hiPSC generadas a partir de pacientes de COXPD1. Después de 24 - 72 horas, determinaremos varios marcadores de biogénesis y (dis)función mitocondrial. Además, realizaremos análisis de metabolómica para determinar cambios en el metaboloma del NAD⁺ y otros metabolitos mitocondriales, tales como intermediarios de TCA, lactato, piruvato, carnitinas y marcadores de estrés oxidativo (p. ej., ácido oftálmico, glutatión oxidado).

Tarea 1.2. Aplicación de la terapia más prometedora a un modelo de ratón de COXPD1

En función de los resultados obtenidos en neuronas derivadas de hiPSC, seleccionaremos el mejor precursor de NAD⁺ y la combinación de precursor y modulador redox (KH176) para administrarlo a un modelo de ratón de COXPD1 durante 3 meses desde su nacimiento. Controlaremos semanalmente el peso corporal, el consumo de alimentos y agua. Después del tratamiento, los animales se sacrificarán y se recogerá hígado y cerebro para su posterior análisis, ya que estos son los órganos más afectados en este modelo. Determinaremos varios marcadores de biogénesis y (dis)función mitocondrial. Además, también

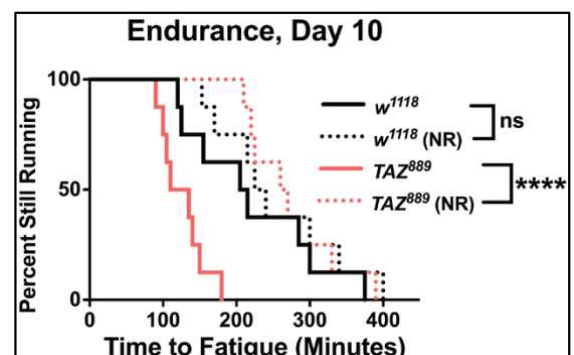


Figura 2. El tratamiento con NR de un modelo de *Drosophila* para el síndrome de Barth (TAZ⁸⁸⁹) incrementa la resistencia a la fatiga hasta niveles similares al de moscas silvestres (*w*¹¹¹⁸).

realizaremos análisis de metabolómica para determinar cambios en el metaboloma NAD+, así como metabolitos mitocondriales, como intermediarios de TCA, lactato, piruvato, carnitinas y marcadores de estrés oxidativo (p. ej., ácido oftálmico, glutatión oxidado).

PLAN DE TRABAJO

| | | Año 1 | | | | Año 2 | | | |
|------------|------------|-------|----|----|----|-------|----|----|----|
| | | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 |
| Objetivo 2 | Tarea 2.1. | ■ | | | | | | | |
| | Tarea 2.2. | | | | ■ | | | | |
| | Tarea 2.3. | | | | | | | ■ | |

DISTRIBUCIÓN DE TAREAS

Listado de tareas y distribución de trabajo

Objetivo 1. Determinar la eficacia de una terapia combinatoria con precursores de NAD+ y moduladores redox

| | |
|-------------|--|
| ASF, RZP | 2.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la eficacia de precursores NAD+ y moduladores redox para COXPD1. |
| RZP | 2.2. Aplicación de la terapia más prometedora a un modelo de ratón de COXPD1. |
| RZP | 2.3. Determinar la mejora el fenotipo de la enfermedad mitocondrial COXPD1 tras la administración de la terapia. |

RRR: Rubén Rabadán Ros; RZP: Rubén Zapata Pérez; END: Estrella Núñez Delicado; ASF: Álvaro Sánchez Ferrer

VIABILIDAD DEL PROYECTO

Los riesgos para el desarrollo de los objetivos de investigación propuestos en este proyecto son bajos. Aunque el proyecto es innovador y ambicioso, la mayor parte del trabajo no está vinculado en el sentido de que el éxito potencial de un objetivo depende de los demás. Además, el proyecto se divide en una serie de hitos específicos, medibles, alcanzables, relevantes y oportunos que permitirán una implementación coherente de las tareas propuestas. Los recursos disponibles en las instituciones participantes (Universidad Católica San Antonio – UCAM, Universidad de Murcia- UMU), y los solicitados en esta propuesta, hacen que este proyecto sea perfectamente factible dentro del presupuesto propuesto.

Los datos preliminares que muestran que los potenciadores de NAD+ pueden aumentar efectivamente la biogénesis y la función mitocondrial hacen que la implementación fallida de este objetivo sea altamente improbable. Además, nuestra preselección *in vitro* de diferentes moduladores en células madre pluripotentes, que pueden diferenciarse en los distintos tipos celulares más relevantes para esta enfermedad, aumentará la probabilidad de éxito en estos objetivos. Al mismo tiempo, proponemos el uso de diferentes potenciadores de NAD+ solos o en combinación con moduladores redox mitocondriales; un enfoque que nunca ha sido probado antes en este contexto. Por lo tanto, incluso en el caso de que las terapias propuestas no promuevan efectos beneficiosos en los modelos de ratón o en células derivadas de pacientes, seguirá siendo muy relevante describir que, en este caso, las terapias no son trasladables entre estos dos modelos.

REFERENCIAS

1. Schaefer, A. M., Taylor, R. W., Turnbull, D. M. & Chinnery, P. F. The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochimica et biophysica acta* **1659**, 115–20 (2004).
2. Schapira, A. H. Mitochondrial disease. *The Lancet* **368**, 70–82 (2006).
3. Terada, T. *et al.* In vivo mitochondrial and glycolytic impairments in patients with Alzheimer disease. *Neurology* **94**, e1592–e1604 (2020).
4. Billingsley, K. J. *et al.* Mitochondria function associated genes contribute to Parkinson's Disease risk and later age at onset. *npj Parkinson's Disease* **5**, 8 (2019).
5. Forbes, J. M. & Thorburn, D. R. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* **14**, 291–312 (2018).
6. Brito, S. *et al.* Long-term survival in a child with severe encephalopathy, multiple respiratory chain deficiency and GFM1 mutations. *Frontiers in genetics* **6**, 102 (2015).
7. Soiferman, D., Ayalon, O., Weissman, S. & Saada, A. The effect of small molecules on nuclear-encoded translation diseases. *Biochimie* **100**, 184–191 (2014).
8. Liang, G. & Zhang, Y. Genetic and Epigenetic Variations in iPSCs: Potential Causes and Implications for Application. *Cell Stem Cell* **13**, 149–159 (2013).
9. Molina-Berenguer, M. *et al.* Dysfunctional mitochondrial translation and combined oxidative phosphorylation deficiency in a mouse model of hepatoencephalopathy due to *Gfm1* mutations. *The FASEB Journal* **36**, (2022).
10. Pirinen, E. *et al.* Niacin Cures Systemic NAD⁺ Deficiency and Improves Muscle Performance in Adult-Onset Mitochondrial Myopathy. *Cell metabolism* **31**, 1078-1090.e5 (2020).
11. Lee, C. F., Caudal, A., Abell, L., Nagana Gowda, G. A. & Tian, R. Targeting NAD⁺ Metabolism as Interventions for Mitochondrial Disease. *Scientific reports* **9**, 3073 (2019).
12. Damschroder, D., Zapata-Pérez, R., Houtkooper, R. H. & Wessells, R. Stimulating the sir2-pgc-1 α axis rescues exercise capacity and mitochondrial respiration in *Drosophila* tafazzin mutants. *bioRxiv*.
13. de Haas, R. *et al.* Therapeutic effects of the mitochondrial ROS-redox modulator KH176 in a mammalian model of Leigh Disease. *Scientific reports* **7**, 11733 (2017).

NOMBRE DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL: Rubén Rabadán Ros

PRESUPUESTO*

Gastos de personal. Personal contratado incluyendo salario y cuotas de la Seguridad Social: 0 €

- No procede

Material Inventariable: 0 €

- No procede

Material fungible: 21.000 €

- Consumibles de uso general de laboratorio: 5.000 €
- Anticuerpos para inmunohistoquímica, western blot, citometría: 3.500 €
- Reactivos de biología molecular (enzimas, sustratos, primers, kits de extracción de RNA, kit de lactato, etc.): 4.000 €
- Material específico para la generación de adenovirus asociados: Plásmidos, placas de cultivos celulares, medios y reactivos para cultivo celular, tubos para ultracentrifugación, columnas de concentración: 4.500 €
- Medios de cultivo y reactivos para generación, mantenimiento y diferenciación de células iPSCs: 2.450 €

Servicios de Apoyo a la Investigación: 12.550 €

- Servicio de medición mediante espectrometría de masas (análisis de metabolómica): 3.000 €
- Cría y mantenimiento de animales de laboratorio: 9.550 €
 - a) Mantenimiento reproductores: 2.630 €
 - b) Expansión y generación de la colonia de ratones modelo: 4.940 €
 - c) Mantenimiento ratones para los experimentos: 1.980 €

Viajes y dietas, asistencia a congresos y conferencias: 2.500 €

Gastos de publicación: 5.500 €

- Corrector nativo de inglés, tarifas de publicación, pósters, etc: 5.000 €

Otros gastos debidamente justificados:

- No procede

SUBTOTAL:

Costes indirectos (*overheads*), hasta un máximo del 21% de los costes directos: 10.000 € (20%)

TOTAL: 50.000 €

(*) El desglose de este presupuesto debe ser razonado y detallado, en especial la necesidad de personal, si la hubiera.