



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Estudio de biomarcadores en los defectos de la fosforilación oxidativa mitocondrial y en las deficiencias de coenzima CoQ₁₀

Abraham José Paredes Fuentes



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Sant Joan de Déu
Barcelona · Hospital



Sant Joan de Déu
Fundació de Recerca

Estudio de biomarcadores en los defectos de la fosforilación oxidativa mitocondrial y en las deficiencias de coenzima CoQ₁₀

Abraham José Paredes Fuentes

2022

Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Programa de Doctorat en Biomedicina

Estudio de biomarcadores en los defectos de la fosforilación oxidativa mitocondrial y en las deficiencias de coenzima CoQ₁₀

La realización de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el
Laboratorio de Metabolopatías del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona -
Institut de Recerca Sant Joan de Déu

Memoria presentada por Abraham José Paredes-Fuentes para optar al
grado de Doctor por la Universitat de Barcelona



Abraham José Paredes Fuentes



Director: Dr. Rafael Artuch Iriberry



Tutor: Dr. Francesc Villarroya Gombau

Barcelona, 2022

A ma mare

El viaje no acaba nunca. Solo los viajeros acaban. E incluso estos pueden prolongarse en memoria, en recuerdo, en relatos. El fin de un viaje es sólo el inicio de otro. Hay que ver lo que no se ha visto, ver otra vez lo que ya se vio, ver en primavera lo que se había visto en verano, ver de día lo que se vio de noche, con el sol lo que antes se vio bajo la lluvia, ver la siembra verdeante, el fruto maduro, la piedra que ha cambiado de lugar, la sombra que aquí no estaba. Hay que volver a los pasos ya dados, para repetirlos y para trazar caminos nuevos a su lado. Hay que comenzar de nuevo el viaje. Siempre. El viajero vuelve al camino.

- 'Viaje a Portugal', José Saramago -

AGRADECIMIENTOS

En primer lloc, vull donar les gràcies a ma mare, sense el seu suport mai hauria arribat tan lluny en aquest viatge. També als meus iaies (iaio Juan, ‘mami’, iaio Sebas i iaia Rafaela), que avui ja no hi són (‘Solo los viajeros acaban’), però continuen amb mi d’alguna manera.

La financiación de este viaje ha sido posible gracias al contrato FI18/00253 del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), la Asociación de Enfermos de Patología Mitocondrial (AEPMI) y la Fundación Ana Carolina Díez Mahou.

Mi agradecimiento a las compañeras y compañeros del Hospital Sant Joan de Déu, tanto a los profesionales de laboratorio (Juanito, Yahel, Aroa, Tania, Adriana, Ángela, Cristina, Aída, Mercedes, Marta, Eli, Clara, Laura, Manel, Velasco, Ana, Loreto, Eloi, Dani, Sara, Patri, Judith, Dèlia, Carlota, Paola, Clara, Ainhoa, Cristina Jou, Jesús, Anna, Mónica, Cristina, Adrián, Esther) como de otras disciplinas (Jaume, Àngels, Mar, Natalia, Alejandra, Darío, Silvia, Mariela, Camila, Lola, Natalia). Gracias también a las investigadoras e investigadores que tan bien me acogieron en sus grupos del Institut de Recerca (Cecilia, Janet, Paco, Mari, Lara, Jordi, Jonathan, Alba). Y, por supuesto, a las compañeras y compañeros de LTR, Microbiología y Banco de Sangre, por tantos buenos momentos compartidos durante las guardias. Mención especial a Raquel por acompañarme en mis primeros pasos en el Laboratorio de Metabolopatías, a Jordi por estar siempre dispuesto a echarme un cable en el Laboratorio de Genética, a Nuri por brindarme siempre una sonrisa y un poco de su tiempo, a Roser por animarme a no tirar la toalla y por compartir conmigo su pasión por la Genética (y por todo lo que suene a friki), y a Selena por las risas compartidas y porque ha sido un verdadero placer trabajar codo con codo con ella.

Mi gratitud a todos los pacientes y familiares que han hecho posible este trabajo, es por ellos que ha merecido la pena tanto esfuerzo. No me olvido de los excelentes profesionales del campo de las enfermedades mitocondriales con los que he tenido el honor de colaborar (Julio, Eduardo, Plácido, Carlos, Miguel Ángel, Marcello, Glòria), un fuerte abrazo para todos ellos.

Agradecer también, por qué no, a todas aquéllas y aquéllos que, como dice la canción, dudaron desde su pedestal y hoy verán al mirlo blanco retar al vendaval. De este viaje salgo convencido de mi valía y mi talento, gracias por ayudarme (sin pretenderlo) a atreverme a reconocerlos y demostrarlos. ¡Mirad cómo floto, mirad cómo vuelo!

Y qué suerte que aún hay gente que hace fácil este viaje, como Marta (mi compañera de aventuras y desventuras), Ester, Lorena, Idoia, Antonio, Abraham, María, Tama, Marc y Marina. ¡Que nuestros discos sigan sonando, dejadlos girar!

Por último, y no por ello menos importante, si no tal vez todo lo contrario, gracias infinitas a quien me ha acompañado de cerca en este viaje, a mi director. Estoy convencido de que no habría podido encontrar a un mejor profesional y persona para hacer mi tesis doctoral, y es por ello que sé que el karma, si es que eso significa algo, ha hecho todo lo posible para que así

fuese. Quienes conocen a Rafa saben lo excelente que es como bioquímico e investigador, pero más aún como persona, y yo sólo puedo corroborarlo diciendo que en un futuro espero parecerme a él, aunque sea sólo un poquito.

ABSTRACT

Diagnosis and research of mitochondrial diseases (MD) remains challenging and there is a need for more sensitive and specific biomarkers that could contribute to easier categorization of these patients and prediction of clinical outcomes. Most routine biomarkers (e.g., lactate, pyruvate, alanine, urinary organic acids, or acylcarnitines) show poor sensitivity and specificity. Recently, it has been reported that cytokines GDF-15 and FGF-21 and plasma gelsolin can improve diagnostic specificity of MD, although altered levels have also been associated with a range of non-MDs. With the advances in next-generation sequencing (NGS) and the discovery of a variety of new disease-specific genes, the ability to diagnose MD has improved enormously. However, many patients with suspected MD remain without a genetic diagnosis, presenting a challenge for clinicians to counsel and manage them. Biomarkers for clinical outcome research are lacking as well.

From the need for better biomarkers arises the main objective of this thesis: to progress the development of biomarkers for the study of patients with MD. The four publications in this work contribute to the advancement of the field of MD biomarkers and coenzyme Q₁₀ (CoQ) deficiencies, by: 1) describing a new biomarker in cerebrospinal fluid for MD diagnosis and research; 2) demonstrating that the quantification of plasma CoQ concentrations are the best surrogate biomarker for monitoring oral CoQ treatment; 3) reporting the importance of the analysis of various biomarkers in the diagnosis of CoQ deficiencies; and 4) developing and validating a new method that allows the detection of CoQ deficiencies and the monitoring of oral CoQ treatment.

ÍNDICE

TABLAS Y FIGURAS	1
Listado de tablas	1
Listado de figuras	2
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	9
1. Mitocondrias y enfermedades mitocondriales	9
2. Deficiencias de coenzima Q ₁₀ (CoQ): un grupo de enfermedades mitocondriales potencialmente tratables	14
2.1. Estructura y funciones de la CoQ	14
2.2. Biosíntesis de la CoQ	16
2.3. Deficiencias primarias y secundarias de CoQ	17
2.3.1. Deficiencias primarias de CoQ	18
2.3.2. Deficiencias secundarias de CoQ	21
2.3.3. Patogénesis de la deficiencia de CoQ	22
2.3.4. Tratamiento de las deficiencias de CoQ	23
3. Biomarcadores en enfermedades mitocondriales	26
OBJETIVOS	33
PUBLICACIONES	37
CAPÍTULO 1	37
Publicación 1:	
<i>Circulating cell-free mitochondrial DNA in cerebrospinal fluid as a biomarker for mitochondrial diseases</i>	37
CAPÍTULO 2	53
Publicación 2:	
<i>Coenzyme Q₁₀ treatment monitoring in different human biological samples</i>	53
Publicación 3:	
<i>Laboratory diagnosis of a case with coenzyme Q₁₀ deficiency</i>	65

CAPÍTULO 3	71
Publicación 4:	
<i>Technical aspects of coenzyme Q₁₀ analysis: validation of a new HPLC-ED method</i>	71
RESULTADOS	99
1. Informe del director	99
2. Resumen global de resultados	103
DISCUSIÓN	109
CAPÍTULO 1: Investigar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y la investigación de enfermedades mitocondriales causadas por defectos OXPHOS: análisis de ADN mitocondrial libre circulante en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedades mitocondriales	110
CAPÍTULO 2: Analizar la concentración de CoQ en diferentes muestras biológicas con fines diagnósticos y de monitorización del tratamiento: determinación de CoQ en plasma, músculo, fibroblastos, orina, plaquetas y células mononucleares	114
Monitorización del tratamiento con CoQ	114
Diagnóstico de un caso con deficiencia primaria de CoQ	117
CAPÍTULO 3: Desarrollar y validar un nuevo procedimiento para analizar las concentraciones de CoQ en plasma de pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial, para su posterior aplicación en otros especímenes biológicos para el diagnóstico de deficiencias de CoQ	119
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	129
APÉNDICE	147

TABLAS Y FIGURAS

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	11
Síndromes clínicos principales asociados a las enfermedades mitocondriales.	
Tabla 2	20
Manifestaciones clínicas de las deficiencias primarias de coenzima Q ₁₀ .	

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	9
Representación esquemática de la cadena respiratoria mitocondrial y del sistema de fosforilación oxidativa.	
Figura 2	14
Estructura química de la coenzima Q ₁₀ (CoQ).	
Figura 3	15
Ciclo redox de la CoQ.	
Figura 4	17
La ruta del mevalonato produce las unidades precursoras isoprenoides necesarias para la biosíntesis de diversas moléculas importantes, incluyendo CoQ, colesterol y dolicol.	
Figura 5	24
Proteinuria en un paciente <i>COQ2</i> durante un período de seguimiento de 50 meses. Veinte días después del inicio de la suplementación con CoQ se observa una disminución muy significativa de los niveles de proteinuria.	
Figura 6	25
Estructuras químicas del 4-hidroxibenzoato (4-HB) y dos análogos, ácido vanílico (VA) y 3,4-dihidroxibenzoato (3,4-dHB), compuestos que podrían ser utilizados para sortear las etapas enzimáticas interrumpidas por mutaciones en <i>COQ6</i> .	
Figura 7	28
Visión general de las principales rutas metabólicas que tienen lugar en la mitocondria (catabolismo de aminoácidos, carbohidratos y ácidos grasos). El desequilibrio en la ratio NADH/NAD ⁺ es un mecanismo frecuente que conduce a un incremento de las concentraciones de algunos biomarcadores en diversos fluidos biológicos.	
Figura 8	121
Sección transversal de la celda electroquímica 6011RS, donde se observan los dos electrodos de trabajo.	

ABREVIATURAS

ATP	adenosina trifosfato
BMCs	células mononucleares de sangre periférica
ccfmtDNA	ADN mitocondrial libre circulante
CoQ	coenzima Q ₁₀
CPEO	oftalmoplejía externa progresiva crónica
ECM	errores congénitos del metabolismo
EM	enfermedades mitocondriales
FADH ₂ /FAD	dinucleótidos de flavina adenina
FGF-21	factor de crecimiento de fibroblastos-21
GDF-15	factor de diferenciación del crecimiento-15
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-ED	HPLC con detección electroquímica
KSS	síndrome de Kearns-Sayre
LC-MS/MS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LCR	líquido cefalorraquídeo
LHON	neuropatía óptica hereditaria de Leber
MDD	síndromes de depleción y deleciones del ADN mitocondrial
MELAS	encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares al ictus
MERRF	epilepsia mioclónica con fibras rojas-rasgadas
MIDD	diabetes y sordera de herencia materna
MNGIE	encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial
MRC	cadena respiratoria mitocondrial
MRI	imagen por resonancia magnética
MS	espectrometría de masas
mtDNA	ADN mitocondrial
NADH/NAD ⁺	dinucleótidos de nicotinamida adenina
NARP	debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa

nDNA	ADN nuclear
NGS	secuenciación de nueva generación
OXPHOS	fosforilación oxidativa
ROS	especies reactivas de oxígeno
SNC	sistema nervioso central
SRNS	síndrome nefrótico resistente a esteroides
tRNAs	ARNs de transferencia
VA	ácido vanílico
VUS	variante de significado incierto
3,4-dHB	3,4-dihidroxibenzoato
4-HB	4-hidroxibenzoato

INTRODUCCIÓN

1. Mitocondrias y enfermedades mitocondriales

Las mitocondrias son orgánulos celulares que se encuentran en todas las células nucleadas, y que desempeñan un papel crucial que consiste en la generación de energía en forma de ATP (adenosina trifosfato) a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), empleando predominantemente carbohidratos y ácidos grasos como combustibles. También desempeñan funciones biológicas fundamentales en otros procesos celulares, tales como la termogénesis, biosíntesis del grupo hemo, homeostasis del calcio y apoptosis. El sistema OXPHOS se localiza en la membrana interna mitocondrial, y está compuesto por cinco complejos proteicos multiméricos: los primeros cuatro complejos (I a IV) forman la cadena respiratoria mitocondrial (MRC), y el complejo V es una ATP sintasa (**Figura 1**) [Ng, 2016]. La OXPHOS es un proceso complejo que implica la transferencia de electrones a lo largo de la MRC mediante una serie de reacciones de oxidación y reducción que finalmente conllevan al consumo de oxígeno en el complejo IV. En todo este proceso es esencial la participación de dos transportadores de electrones, la coenzima Q_{10} (CoQ) y el citocromo c , que se desplazan entre los complejos. Una consecuencia de este transporte de electrones es la extrusión de protones al espacio intermembrana en los complejos I, III y IV. El gradiente de protones así generado se disipa entonces a través del complejo V, y como resultado se produce la condensación de adenosina difosfato con fosfato inorgánico para formar ATP, una molécula con un alto contenido energético en el tercer enlace fosfato [Kisler, 2010].

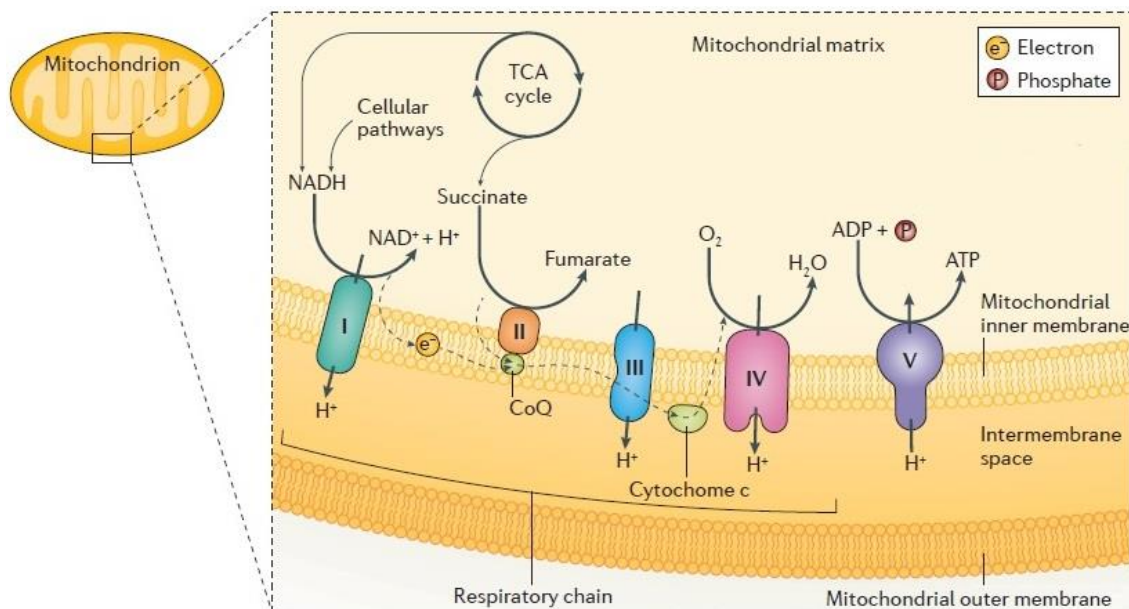


Figura 1. Representación esquemática de la cadena respiratoria mitocondrial y del sistema de fosforilación oxidativa. Adaptada de [Gorman, 2016].

Las mitocondrias son únicas en el sentido en que tienen su propio ‘pool’ de ADN, el ADN mitocondrial (mtDNA), que es distinto del ADN nuclear (nDNA). El mtDNA es de herencia materna y tiene un origen evolutivo diferente del nDNA, que se remonta a los tiempos en los que las mitocondrias eran organismos independientes antes de formar una relación de simbiosis con las células eucariotas [Davis, 2012]. Se trata de una molécula de ADN de doble cadena, que codifica para trece subunidades proteicas que forman parte del sistema OXPHOS y veinticuatro moléculas de ARN que son necesarias para la síntesis mitocondrial de proteínas. A diferencia del nDNA, el mtDNA es circular y carece de una estructura tipo exón-intrón. Además, el genoma mitocondrial es poliploide, con múltiples copias de mtDNA dentro de cada célula, y la cantidad total puede variar en función del tipo de célula. Todo esto conlleva a que en la presentación de las enfermedades mitocondriales (EM) se observe una compleja transmisión de las mutaciones (dado que cualquier tipo de herencia es posible) y una gran variabilidad genotipo-fenotipo. De hecho, muchos pacientes con EM tienen una mezcla de moléculas de mtDNA mutadas y silvestres, situación que se conoce como heteroplasmia. La heteroplasmia explica porqué la enfermedad no se presenta en todos aquellos pacientes con mutaciones en el mtDNA, ya que para algunas de ellas se requiere superar un determinado valor umbral de moléculas de mtDNA mutadas antes de que las consecuencias clínicas sean aparentes. Este valor umbral puede variar entre individuos, tejidos y mutaciones específicas del mtDNA [Kisler, 2010; Gorman, 2016].

Las EM representan un grupo de enfermedades clínicas, bioquímicas y genéticamente heterogéneas que alteran la estructura o funciones mitocondriales y que conducen, entre otros factores fisiopatológicos, a un descenso de la biosíntesis de ATP mediante el sistema OXPHOS. Como aproximadamente el 90% del ATP se sintetiza en las mitocondrias, aquellas células con gran demanda energética (tales como las del músculo esquelético y cardíaco, y las neuronas) son particularmente vulnerables a este aporte limitado de ATP y se ven frecuentemente afectadas en los diversos fenotipos que presentan los pacientes con EM [Kisler, 2010; Davis, 2012]. Las EM pueden estar causadas por mutaciones tanto en genes mitocondriales como nucleares que interfieren directa o indirectamente en la función de la MRC. Hasta la fecha, los análisis proteómicos mitocondriales han revelado que, además de las trece proteínas codificadas por el genoma mitocondrial, hay aproximadamente unas 1.500 proteínas relacionadas con diversas funciones mitocondriales, y más de 450 genes están implicados en el desarrollo de patología en humanos [Ng, 2016; Stenton, 2020]. Por un lado, las variantes patogénicas en el mtDNA pueden afectar a las subunidades estructurales de la MRC o a la maquinaria de síntesis mitocondrial de proteínas; en este sentido, se han reportado cientos de mutaciones puntuales y de reordenamientos a gran escala del mtDNA como causantes de enfermedad [Gorman, 2016]. Por otro, las variantes en el nDNA pueden ser estructurales y afectar a los complejos de la

MRC, o no estructurales y afectar a la replicación y reparación del mtDNA, al metabolismo y a la integridad mitocondrial [Kisler, 2010].

Las manifestaciones clínicas de las EM son muy heterogéneas, y su presentación suele depender de si el descenso en la producción de ATP es generalizado o específico de un órgano o tejido, junto con la contribución de los otros aspectos fisiopatológicos mencionados. No obstante, es muy complicado hacer una predicción sobre qué órganos pueden verse afectados y en qué medida. Así, algunas de estas enfermedades afectan a un único órgano (por ejemplo, el ojo en la neuropatía óptica hereditaria de Leber o LHON), pero muchas otras implican a diversos órganos y sistemas. En principio, cualquier órgano puede verse afectado pero, como ya se ha dicho, aquéllos con mayor demanda energética son los que más frecuentemente se ven afectados, tales como cerebro, músculo, corazón e hígado. Además, las EM pueden manifestarse a cualquier edad desde el nacimiento hasta la edad adulta, ya sea de forma aguda o como una enfermedad crónica progresiva [Magner, 2015]. El debut de la enfermedad en la edad pediátrica se asocia a una afectación multisistémica más severa, peor progresión y peor pronóstico [Ng, 2016].

Durante las últimas décadas se han descrito diversos síndromes bien definidos (**Tabla 1**). Sin embargo, es frecuente encontrar una variabilidad clínica considerable y muchos pacientes no encajan en una categoría particular [Magner, 2015]. Además, muchos síntomas asociados a las EM (tales como sordera, diabetes, miopatía o síntomas gastrointestinales) son también comunes en la población general [Ng, 2016].

Síndromes clínicos de inicio neonatal y en la infancia

- Síndrome de Alpers-Huttenlocher
 - Espectro de neuropatía atáxica
 - Espectro de miocerebrohepatopatía infantil
 - Acidosis láctica congénita
 - Síndrome de Leigh
 - Síndrome MEGDEL (aciduria 3-metilglutacónica con sordera, encefalopatía y síndrome de Leigh-like)
 - Ataxia sensorial con miopatía epiléptica mioclónica
 - Síndrome de Pearson
 - Síndrome de Sengers
-

Síndromes clínicos asociados con la adolescencia y la edad adulta

- Oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO)
 - Síndrome de Kearns-Sayre (KSS)
 - Neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON)
 - Síndrome MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares al ictus)
 - Síndrome MNGIE (encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial)
 - Epilepsia mioclónica con fibras rojas-rasgadas (MERRF)
 - Debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP)
-

Tabla 1. Síndromes clínicos principales asociados a las enfermedades mitocondriales.

Adaptada de [Gorman, 2016].

En general, muchas EM no tienen características patognomónicas que apunten hacia un diagnóstico genético particular [Ng, 2016]. El diagnóstico también se complica porque frecuentemente no hay una buena relación entre el genotipo y el fenotipo clínico observado. Por ejemplo, algunas variantes del mtDNA pueden dar lugar a diversos síndromes clínicos; así, la variante m.3243A>G (en el gen *MT-TL1*) puede causar oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO), síndrome de MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares al ictus) y síndrome MIDD (diabetes y sordera de herencia materna). Lo contrario también ocurre porque algunos síndromes específicos pueden tener una etiología genética diferente; por ejemplo, el síndrome de Leigh puede estar causado por una diversidad de variantes en genes tanto del mtDNA como del nDNA [Nesbitt, 2013; Gorman, 2016; Lake, 2016].

Debido a todas estas razones que acabamos de mencionar, es fácil entender que el diagnóstico de las EM puede llegar a suponer todo un desafío para los profesionales sanitarios implicados. Por ello, es necesario tener en cuenta tanto la historia personal como familiar, el curso de la enfermedad, un examen clínico exhaustivo, los exámenes complementarios (especialmente cardiológicos, visuales, pruebas de imagen cerebrales y electromiografía), así como los resultados de los análisis de laboratorio en diversas muestras biológicas. Todos estos datos pueden ayudar a dirigir los estudios genéticos hacia un gen concreto, aunque es cierto que frecuentemente esto no es posible y suelen usarse otras aproximaciones mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) [Magner, 2015; Stenton, 2020]. Actualmente, los estudios genéticos permiten que se pueda prescindir de la necesidad de tener que utilizar

biopsias de tejido para el diagnóstico en la mayoría de casos, al menos en una primera fase del estudio, aunque es cierto que en ocasiones sí son necesarias para la caracterización bioquímica y funcional de las posibles variantes de significado incierto (VUS) que puedan encontrarse [Gorman, 2016; Phadke, 2017; Stenton, 2020].

Por último, además del reto diagnóstico, los profesionales también encuentran dificultades en el manejo de los pacientes con EM debido a la falta de terapias efectivas que modifiquen el curso de la enfermedad. Debido a que se trata de enfermedades clínica y genéticamente heterogéneas, no existe una única aproximación terapéutica que pueda utilizarse frente a los distintos mecanismos bioquímicos responsables de la enfermedad. Se ha reportado el uso de diversos tratamientos, la mayoría basados en suplementos tales como CoQ, carnitina, creatina, dicloroacetato y ‘cócteles’ de vitaminas [Hirano, 2012; Ng, 2016]. El fundamento fisiológico de la suplementación con vitaminas consiste en eliminar los metabolitos tóxicos o promover la producción de ATP mediante el uso de mediadores de la CRM con tal de sortear el defecto metabólico [Kisler, 2010]. A pesar de que estos tratamientos se han venido utilizando desde hace años, la evidencia científica disponible sigue siendo escasa y sugiere que tendrían efectos beneficiosos más bien modestos, al menos cuando se aplican de forma generalizada [Camp, 2016; Gorman, 2016]. Hay ciertas EM que sí pueden responder razonablemente bien a terapias dirigidas, como es el caso de la deficiencia de timidina quinasa (TK2), los defectos de tiamina o las deficiencias primarias de CoQ, entre otras [Couce, 2022].

2. Deficiencias de coenzima Q₁₀ (CoQ): un grupo de enfermedades mitocondriales potencialmente tratables

2.1. Estructura y funciones de la CoQ

La CoQ es el único lípido con propiedades redox que se sintetiza endógenamente y que se encuentra en todas las células eucariotas, siendo especialmente abundante en las mitocondrias [Alcázar-Fabra, 2018]. Fue aislada y caracterizada por Festenstein y colaboradores en 1955, y dos años más tarde Crane y su equipo reportaron que esta molécula actúa como miembro de la MRC. Wolf y colaboradores determinaron su estructura en 1958, la cual es compleja y está compuesta por un anillo de benzoquinona con actividad redox y una cola poliisoprenoide de diferentes longitudes: diez unidades de isopreno en humanos (CoQ₁₀), nueve en ratones (CoQ₉) y seis en levaduras (CoQ₆) (**Figura 2**) [Turunen, 2004; Trevisson, 2011].

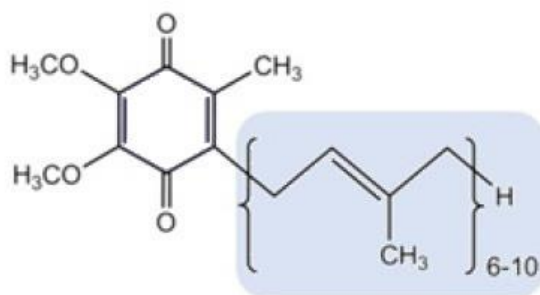


Figura 2. Estructura química de la coenzima Q₁₀ (CoQ). Adaptada de [Alcázar-Fabra, 2018].

La CoQ experimenta constantemente ciclos de oxidación-reducción, y puede encontrarse en la forma completamente reducida (ubiquinol) después de recibir dos electrones, o en una forma completamente oxidada (ubiquinona) (**Figura 3**). Cuando este ciclo redox ocurre mediante una transferencia en dos pasos de un electrón cada uno, se produce un producto intermedio semiquinona (semi-ubiquinona) [Alcázar-Fabra, 2018].

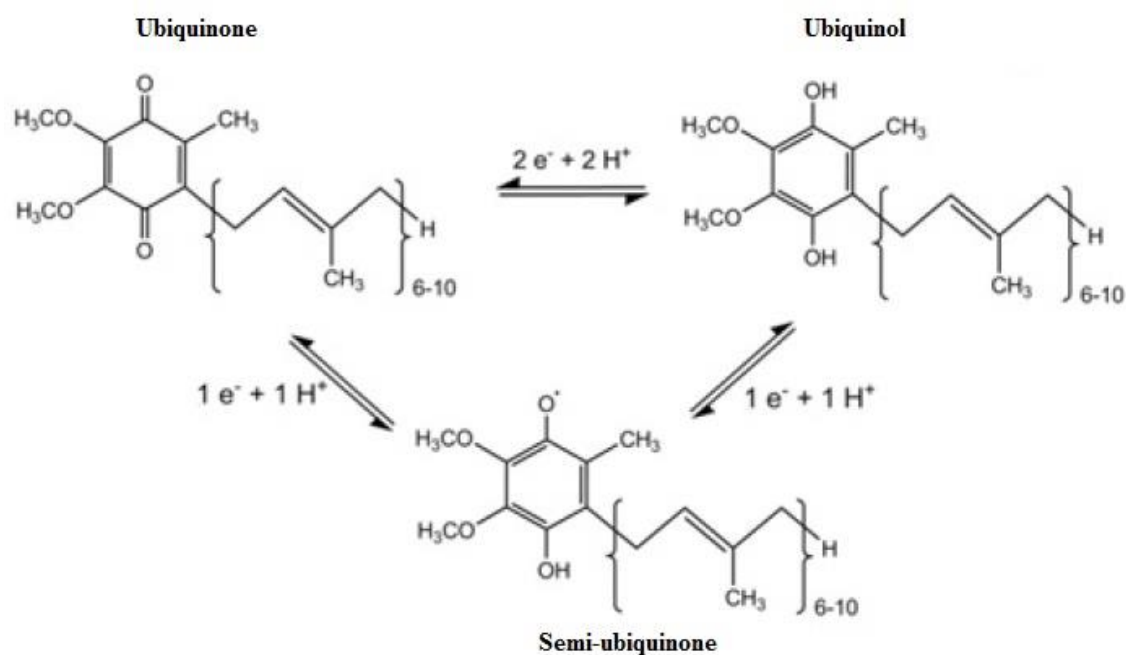


Figura 3. Ciclo redox de la CoQ. Adaptada de [Alcázar-Fabra, 2018].

Esta habilidad para experimentar ciclos redox de forma continua hace de la CoQ un excelente transportador de electrones en muchas vías celulares que son cruciales para el organismo [Acosta, 2016]. En este sentido, la CoQ constituye un elemento esencial de la MRC, transportando electrones desde los complejos I y II al complejo III en la membrana mitocondrial interna (**Figura 1**) [Laredj, 2014].

La CoQ es también un potente antioxidante de membrana que protege a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos del daño oxidativo. La alta eficiencia de esta molécula frente al estrés oxidativo parece estar relacionada con su distribución ubicua, su localización en el ‘core’ de las membranas y la disponibilidad de diversas deshidrogenasas capaces de regenerarla [Bentinger, 2007; Alcázar-Fabra, 2018].

Además de su papel fundamental en la MRC y su función como antioxidante, la CoQ también está implicada en diversos aspectos del metabolismo celular [Turunen, 2004; Trevisson, 2011; Desbats, 2015]:

- Participación en el transporte de electrones extra-mitocondrial
- Regulación de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial
- Activación de las proteínas desacopladoras mitocondriales
- Cofactor de diversas deshidrogenasas mitocondriales, incluyendo un enzima implicado en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidinas
- Regulación de las propiedades fisicoquímicas de las membranas
- Modulación de la cantidad de β_2 -integrinas en la superficie de los monocitos

- Mejora de la disfunción endotelial

2.2. Biosíntesis de la CoQ

Todas las células de los mamíferos tienen la capacidad de sintetizar CoQ. Su disponibilidad también viene dada por la dieta, que influye en las concentraciones plasmáticas hasta en un 25% del total, aunque la distribución de la CoQ plasmática a través de las células y tejidos parece limitada [Miles, 2007; Yubero, 2018].

La CoQ se sintetiza mediante un conjunto de proteínas codificadas por el nDNA a través de una ruta que todavía no se comprende bien del todo. La mayoría de los estudios sobre la biosíntesis de la CoQ se han realizado en levaduras, y en este organismo se han identificado al menos trece genes responsables. La información de la que disponemos acerca de la ruta biosintética de la CoQ en humanos es escasa, pero se han identificado los ortólogos de casi todos esos genes [Alcázar-Fabra, 2018; Awad, 2018]. En levaduras, las proteínas Coq se ensamblan en un complejo de múltiples subunidades que requiere de la presencia de todos los componentes para su estabilidad. Este complejo parece estar también presente en mamíferos, aunque la composición y organización exactas no están completamente claras todavía [Desbats, 2015].

En cualquier caso, en mamíferos, el precursor del anillo de benzoquinona es el 4-hidroxibenzoato (4-HB), que deriva del aminoácido tirosina a través de una serie de reacciones no del todo conocidas (**Figura 4**). La cola poliisoprenoide se sintetiza a través de la ruta del mevalonato (que es también común a la biosíntesis del colesterol y dolicol), y comprende una serie de reacciones que partiendo del acetil-coenzima A (acetil-CoA) produce farnesil-pirofosfato (FPP) [Acosta, 2016]. Este último, tras convertirse en decaprenil-pirofosfato (decaprenil-PP), se condensa con el 4-HB a decaprenil-4-hidroxibenzoato (decaprenil-4-HB), el cual se convierte en CoQ tras una serie de reacciones adicionales. Mientras que la mayoría de las primeras etapas tiene lugar en el citosol, aquéllas que son específicas de la biosíntesis de la CoQ (empezando con la generación de la cadena lateral a partir del FPP) tienen lugar en la mitocondria [Laredj, 2014].

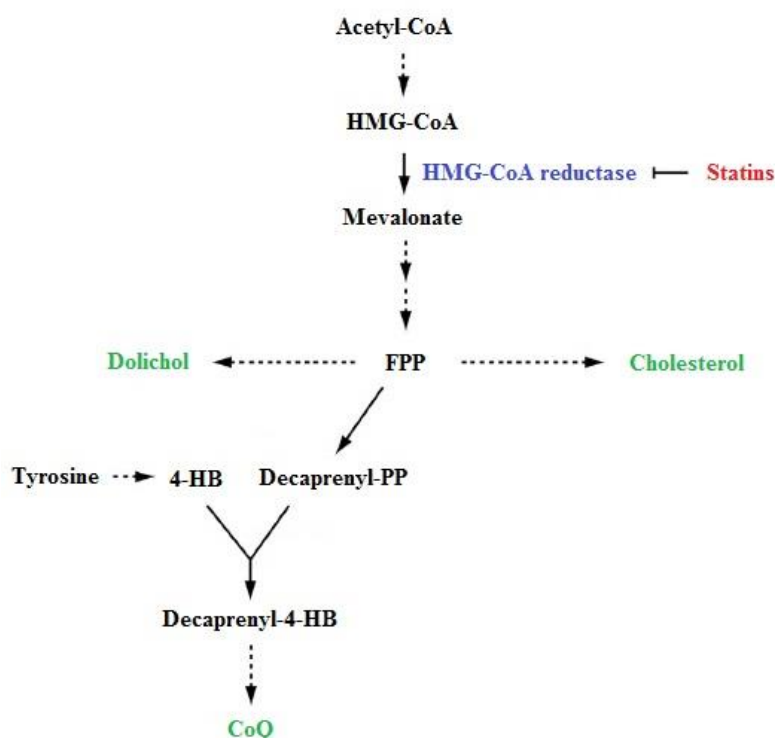


Figura 4. La ruta del mevalonato produce las unidades precursoras isoprenoides necesarias para la biosíntesis de diversas moléculas importantes, incluyendo CoQ, colesterol y dolicol.

Adaptada de [Laredj, 2014].

Aunque se han ido descubriendo muchos aspectos de la biosíntesis de la CoQ, poco se conoce sobre la regulación de este proceso, que podría tener lugar a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona, o incluso durante el ensamblaje del supuesto complejo multi-subunidades [Alcázar-Fabra, 2018]. De la misma manera, se desconocen muchos aspectos sobre la vía de degradación de la CoQ. Su vida media en tejidos es considerablemente larga (del orden de varios días), y sus catabolitos pueden encontrarse en orina y heces. Éstos consisten en el anillo y una cadena lateral corta, que están fosforilados, pero se desconocen muchos de los enzimas que catalizan estos procesos [Trevisson, 2011].

2.3. Deficiencias primarias y secundarias de CoQ

Las deficiencias de CoQ son EM con diferentes presentaciones clínicas que pueden definirse por la presencia de una disminución de las concentraciones de CoQ en sangre y tejidos. Se trata de un hallazgo bioquímico que no se observa en individuos sanos. La síntesis endógena de CoQ suele ser suficiente para mantener las concentraciones dentro de los intervalos de referencia, por lo que las deficiencias dietéticas de CoQ no suelen producir deficiencia en tejidos, sólo en plasma [Montero, 2019]. Dado que la CoQ desempeña funciones que son esenciales para el

organismo, un déficit de esta molécula en tejidos conduce a una serie de EM con un espectro clínico heterogéneo que engloba al menos cinco grandes fenotipos: 1) encefalomiopatía caracterizada por mioglobulinuria recurrente, 2) enfermedad multisistémica infantil severa con encefalopatía, 3) síndrome atáxico con atrofia cerebelosa, 4) miopatía aislada, y 5) síndrome nefrótico resistente a esteroides (SRNS) [Emmanuele, 2012; Potgieter, 2013; Laredj, 2014].

Aunque los primeros pacientes que presentaban muy bajas concentraciones de CoQ en músculo fueron descritos en 1989 por Ogasahara y colaboradores, las causas genéticas de estos hallazgos no se conocieron hasta 2006, cuando se describieron por primera vez las causas moleculares de la deficiencia de CoQ [Ogasahara, 1989; López, 2006; Quinzii, 2006]. La identificación de los defectos moleculares permitió proponer una clasificación genética, que distingue entre: 1) deficiencias primarias, que son aquéllas causadas por mutaciones en genes relacionados con la biosíntesis de la CoQ, y 2) formas secundarias, que son aquéllas debidas a mutaciones en genes no relacionados con la ruta biosintética de la CoQ o a causas no genéticas [Trevisson, 2011; Yubero, 2016]. La existencia de las formas secundarias, que son mucho más frecuentes que los defectos primarios, es importante porque pone de manifiesto la facilidad con la que puede verse perturbada la biosíntesis de la CoQ [Acosta, 2016]. Hay que señalar que un porcentaje considerable de pacientes con diagnóstico bioquímico de deficiencia de CoQ carece de diagnóstico molecular definitivo y que, por tanto, no es posible clasificarlos en formas primarias o secundarias [Desbats, 2015].

2.3.1. Deficiencias primarias de CoQ

Las deficiencias primarias de CoQ son enfermedades muy raras generalmente asociadas a manifestaciones multisistémicas muy variables, y genéticamente son de herencia autosómica recesiva. Se estima que afectan a 1 de cada 50.000 individuos, teniendo en cuenta la frecuencia de las distintas variantes patogénicas identificadas en determinadas poblaciones [Hughes, 2017; Alcázar-Fabra, 2018].

Hasta la fecha, se han reportado variantes patogénicas asociadas a deficiencias de CoQ en humanos en nueve genes que codifican para proteínas de la biosíntesis del CoQ (*COQ2*, *COQ4*, *COQ6*, *COQ7*, *COQ8A*, *COQ8B*, *COQ9*, *PDSS1* y *PDSS2*); la asociación de otros cuatro genes (*ADCK2*, *COQ5*, *COQ10A* y *COQ10B*) con las deficiencias de CoQ todavía está pendiente de confirmación. Dichas variantes afectan a múltiples órganos y sistemas de una manera muy variable, incluyendo el sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso periférico, riñón, músculo esquelético, corazón y órganos sensoriales (**Tabla 2**). Mientras que muchos signos y síntomas reportados en pacientes con deficiencia de CoQ son comunes a otras EM, algunas características son típicas de algunas formas de deficiencia de CoQ, como el SRNS [Acosta,

2016; Salviati, 2017; Alcázar-Fabra, 2018]. Entre las manifestaciones clínicas de las deficiencias primarias de CoQ, las más frecuentes son la encefalomiopatía, la nefropatía y la ataxia cerebelosa. Estas presentaciones son indicativas de que el músculo esquelético, riñón y cerebelo tienen una susceptibilidad relativamente mayor que otros órganos al daño bajo condiciones de deficiencia de CoQ, probablemente debido a un margen de seguridad relativamente estrecho respecto al contenido de CoQ [Hirano, 2012; Rahman, 2012; Wang, 2013].

La variabilidad clínica de las deficiencias primarias de CoQ afecta a la edad de presentación (desde el nacimiento hasta la séptima década de la vida), la severidad de la enfermedad (desde una presentación multisistémica fatal hasta manifestaciones leves y específicas de tejido), el patrón de afectación de los tejidos (incluso para pacientes con mutaciones en el mismo gen), y la respuesta clínica a la suplementación con CoQ [Desbats, 2015]. Esta heterogeneidad clínica queda bien ilustrada con aquellos pacientes con las mismas mutaciones en el gen *COQ2* pero que fenotípicamente parecen distintos. Por ejemplo, el primer paciente reportado con una mutación con cambio de sentido en homocigosis en *COQ2* presentó nistagmus a los dos meses de vida y desarrolló un SRNS severo, encefalomiopatía progresiva, hipotonía, convulsiones y otros síntomas a los 12-18 meses, mientras que su hermana pequeña presentó un síndrome nefrótico a los 12 meses de vida sin otro signo clínico de afectación neurológica [Quinzii, 2006; Wang, 2013].

Esta considerable heterogeneidad en la expresión clínica de las deficiencias primarias de CoQ podría ser un reflejo de las diferencias en las actividades residuales de las proteínas mutadas y, por tanto, de distintos grados de deficiencia de CoQ. También existe la posibilidad que las proteínas COQ tengan otras funciones más allá de la biosíntesis del CoQ. Además, es razonable pensar que algunos productos intermedios de la biosíntesis del CoQ y las proteínas defectuosas puedan tener alguna actividad biológica, que podría contribuir a la variabilidad de las manifestaciones clínicas de los diferentes defectos moleculares [Wang, 2013].

Gen	Manifestaciones clínicas					
	Renales	Cardíacas	Visuales	Auditivas	Neurológicas	Musculares
<i>COQ2</i>	SRNS	HCM	Retinopatía	SNHL	Encefalopatía, convulsiones, otras	Miopatía
<i>COQ4</i>		Insuficiencia cardíaca, HCM			Encefalopatía, convulsiones, otras	Miopatía
<i>COQ6</i>	SRNS			SNHL	Encefalopatía, convulsiones	
<i>COQ7</i>					Encefalopatía, ID, neuropatía periférica	Debilidad muscular
<i>COQ8A</i>					Encefalopatía, ataxia cerebelosa, distonía, espasticidad, convulsiones	Intolerancia al ejercicio
<i>COQ8B</i>	SRNS				ID	
<i>COQ9</i>	Tubulopatía	HCM			Encefalopatía	Miopatía
<i>PDSS1</i>			Atrofia óptica		Encefalopatía, neuropatía periférica	
<i>PDSS2</i>	SRNS		Retinopatía	SNHL	Síndrome de Leigh, ataxia	

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de las deficiencias primarias de coenzima Q₁₀. Abreviaturas: HCM, miocardiopatía hipertrófica; ID, discapacidad intelectual; SNHL, pérdida auditiva neurosensorial; SRNS, síndrome nefrótico resistente a esteroides. Adaptada de [Salviati, 2017].

2.3.2. Deficiencias secundarias de CoQ

También es posible observar una disminución de las concentraciones de CoQ debida a situaciones no directamente relacionadas con la biosíntesis de la CoQ pero sí con la OXPHOS, otros procesos mitocondriales no OXPHOS o, incluso, funciones no mitocondriales. Se ha demostrado que las deficiencias secundarias de CoQ son más frecuentes que las primarias, probablemente debido a la diversidad de funciones biológicas y vías metabólicas en las que la CoQ está implicada en membranas mitocondriales y no mitocondriales [Desbats, 2015; Yubero, 2016; Alcázar-Fabra, 2018].

Los mecanismos exactos por los que estos defectos causan una deficiencia de CoQ siguen sin conocerse, aunque se han propuesto diversas hipótesis: interferencia con las vías de señalización que regulan la biosíntesis de la CoQ, alteración del medio de la membrana interna mitocondrial, reducción de la estabilidad del complejo biosintético de la CoQ, aumento de la tasa de degradación de la CoQ debido a daño oxidativo causado por una MRC no funcional, o un mal funcionamiento general de la función mitocondrial. Aunque ninguna de estas hipótesis ha sido todavía demostrada, la explicación más plausible podría ser una combinación de diferentes factores [Desbats, 2015; Alcázar-Fabra, 2018].

Los síntomas específicos de las deficiencias secundarias de CoQ dependen de la enfermedad subyacente. La mayoría de los estudios publicados se han centrado en músculo esquelético y SNC, y se ha reportado que las manifestaciones musculares consisten en debilidad, hipotonía, intolerancia al ejercicio o mioglobulinuria, mientras que las manifestaciones del SNC incluyen ataxia y deterioro general del mismo. Aunque en estas situaciones la deficiencia de CoQ es un fenómeno secundario, es probable que exacerbe los síntomas causados por el defecto primario, y estos pacientes suelen beneficiarse de la suplementación oral con CoQ, aunque la respuesta no sea tan dramática como en aquéllos con las formas primarias [Quinzii, 2011; Desbats, 2015].

La deficiencia de CoQ es un hallazgo frecuente en pacientes con EM, especialmente en las miopatías mitocondriales [Sacconi, 2010]. En este sentido, el análisis de muestras de músculo y fibroblastos de pacientes afectos por un amplio abanico de EM demostró que las deficiencias secundarias de CoQ eran más frecuentes en los síndromes de depleción del mtDNA en comparación con otras EM [Montero, 2013; Yubero, 2016]. Otras enfermedades pueden cursar también con una disminución de la CoQ, incluyendo la ataxia con apraxia oculomotora, síndrome cardiofaciocutáneo, deficiencia múltiple de acil-CoA deshidrogenasas, aciduria metilmalónica, fenilcetonuria o mucopolisacaridosis, entre otras [Yubero, 2016; Montero, 2019]. Además, las deficiencias secundarias de CoQ pueden originarse como resultado del uso de ciertos agentes farmacoterapéuticos como son las estatinas, que actúan como inhibidores del enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa y, por tanto, interfieren no

sólo con la biosíntesis del colesterol sino también con la de la CoQ (**Figura 4**) [Potgieter, 2013; Desbats, 2015].

Por último, es importante tener en cuenta que la deficiencia de CoQ no es una situación constante en todas las enfermedades que se acaban de indicar, lo que podría sugerir que entre distintos individuos existe una diferente susceptibilidad al desarrollo de la misma. Actualmente, no se dispone de una explicación general para esto, aunque se ha propuesto que podría deberse a factores genéticos tales como determinados polimorfismos [Desbats, 2015; Alcázar-Fabra, 2018].

2.3.3. Patogénesis de la deficiencia de CoQ

La patogénesis de la deficiencia de CoQ es compleja y no se conoce completamente, pero parece implicar dos aspectos principales: 1) una disminución en la producción de ATP, y 2) una alteración de los niveles de estrés oxidativo. En este sentido, se ha reportado que análogos de cadena corta de la ubiquinona tales como la idebenona (que son buenos antioxidantes pero no rescatan la respiración mitocondrial) no son efectivos en el tratamiento de las deficiencias de CoQ, lo que indicaría que ambos aspectos (el defecto bioenergético y la producción incrementada de especies reactivas de oxígeno o ROS) son relevantes para la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, el amplio espectro de funciones que tiene la CoQ, los roles poco conocidos de algunos productos de los genes *COQ* y la considerable variabilidad fenotípica de los pacientes sugieren que también podrían contribuir otros mecanismos [Acosta, 2016; Alcázar-Fabra, 2018].

En primer lugar, dado que la CoQ es un componente esencial de la MRC, su deficiencia (independientemente de que se trate de una forma primaria o secundaria) causa una alteración del transporte de electrones al complejo III y, por tanto, una inhibición de la OXPHOS y de la producción de ATP en las células (**Figura 1**) que finalmente compromete diversas funciones celulares [Desbats, 2015].

En segundo lugar, la CoQ juega un papel esencial tanto en la generación de ROS como en la defensa antioxidante. Por un lado, es el único antioxidante lipofílico que se sintetiza endógenamente y que previene a la célula del daño oxidativo mediante el secuestro directo de radicales libres o bien regenerando otros antioxidantes (como las vitaminas C y E). Por otro, la CoQ también actúa como pro-oxidante, principalmente a través del intermedio semiquinona que se forma durante el transporte de electrones (**Figura 3**), el cual parece ser capaz de donar su electrón libre al oxígeno a nivel del complejo III, conduciendo a la formación del anión superóxido, que es precursor de otras ROS [Wang, 2013]. En células en cultivo, se ha reportado que existe una relación inversa entre la severidad de la deficiencia de CoQ y la producción de

ROS, tal que incluso defectos relativamente sutiles no alteran significativamente la producción de ATP pero causan un incremento significativo de la producción de ROS y, por tanto, pueden ser perjudiciales para la célula [Quinzii, 2010; Desbats, 2015; Alcázar-Fabra, 2018].

Por último, hay evidencias de que otras funciones de la CoQ están también implicadas en la patogénesis de la enfermedad. En este sentido, se han reportado pacientes con deficiencias de CoQ y disfunción del metabolismo de los nucleótidos (como ya se ha dicho, la CoQ es necesaria para la biosíntesis de pirimidinas), incremento de la apoptosis celular y mitofagia, y alteración de la ruta de oxidación mitocondrial del sulfuro [Yubero, 2018].

2.3.4. Tratamiento de las deficiencias de CoQ

Las deficiencias primarias de CoQ son únicas entre las EM porque se dispone de una terapia efectiva para los pacientes, que es la suplementación por vía oral con CoQ. Por esta razón, en 2016 la Agencia Europea del Medicamento aprobó el uso del ubiquinol como fármaco huérfano para las deficiencias primarias de CoQ [Rodríguez-Aguilera, 2017]. Excepto en pacientes con mutaciones en los genes *COQ8A* y *COQ9*, la mayoría de individuos con formas primarias tienen una buena respuesta a la suplementación con CoQ, que generalmente es evidente a los 10-20 días tras el inicio del tratamiento. Actualmente, la suplementación oral con CoQ a altas dosis (que varían de 5 a 50 mg/kg/día) ha demostrado ser relativamente efectiva para el tratamiento tanto de las deficiencias primarias como secundarias [Salviati, 2017; Alcázar-Fabra, 2018].

Se ha reportado que la suplementación con CoQ puede detener la progresión de la encefalopatía y la afectación renal en pacientes con mutaciones en *COQ2*, *COQ6* y *COQ8B*. Sin embargo, es esencial instaurar el tratamiento tan pronto como sea posible dado que una vez que ocurre el daño en órganos críticos (tales como el riñón o SNC), sólo es posible una recuperación residual [Trevisson, 2011; Acosta, 2016]. Por ejemplo, Montini y colaboradores reportaron una recuperación progresiva de la función renal y disminución de los niveles de proteinuria tras 20 días de suplementación con CoQ (**Figura 5**) en una paciente con una mutación con cambio de sentido en homocigosis en *COQ2* que había desarrollado un síndrome nefrótico a los 12 meses de vida [Montini, 2008].

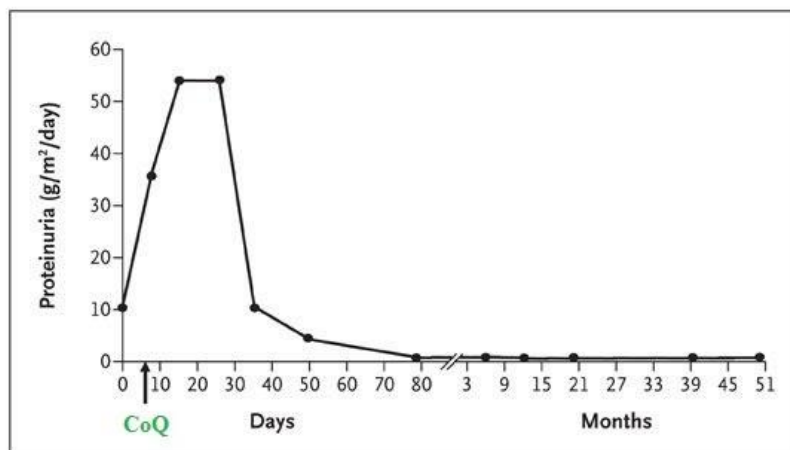


Figura 5. Proteinuria en una paciente COQ2 durante un período de seguimiento de 50 meses.

Veinte días después del inicio de la suplementación con CoQ (indicado con una flecha) se observa una disminución muy significativa de los niveles de proteinuria.

Adaptada de [Montini, 2008].

Los pacientes con deficiencia de CoQ tienen una respuesta clínica variable a la suplementación con CoQ, y en esta variabilidad parecen influir diversos aspectos. Por un lado, factores evidentes tales como las dosis terapéuticas, formulación farmacéutica utilizada, severidad de la enfermedad de base y progresión del daño tisular, pero probablemente también muchos otros componentes que modulan la respuesta al tratamiento (genéticos, ambientales e, incluso, epigenéticos). En este sentido, es importante administrar las dosis adecuadas y las formulaciones apropiadas dado que a menudo los pacientes reciben dosis insuficientes de CoQ [Doimo, 2014; Desbats, 2015]. Por otro lado, otro factor que probablemente contribuye a la diversidad en la respuesta clínica a la CoQ es su baja biodisponibilidad. En humanos, menos del 5% de la CoQ administrada por vía oral alcanza el plasma, y los estudios en roedores han demostrado una baja captación por los tejidos, con muy poca o ninguna captación por el cerebro excepto en ratas adultas; por tanto, la barrera hematoencefálica parece dificultar la captación de la CoQ por parte del SNC. Además, dado que la molécula es altamente lipofílica, la CoQ administrada exógenamente se integrará en el plasma y otras membranas celulares antes de alcanzar la membrana mitocondrial interna. Teniendo en cuenta tanto la baja biodisponibilidad como la captación mitocondrial tardía, parece evidente que una suplementación precoz y a elevadas dosis puede tratar con mayor probabilidad de éxito una deficiencia de CoQ [Turunen, 2004; Hirano, 2012].

Para el tratamiento de las deficiencias primarias de CoQ, se ha reportado el uso de diferentes dosis, siendo 30 mg/kg/día (dividida en tres tomas) efectiva en niños tanto para los síntomas neuromusculares como renales; dosis superiores son bien toleradas y no se han comunicado

efectos secundarios graves [Trevisson, 2011]. Las dosis divididas en varias tomas son de elección frente a las dosis únicas dado que la eficiencia de la absorción disminuye con el aumento de la dosis individual de CoQ [Potgieter, 2013; Desbats, 2015].

Actualmente, hay disponibles diferentes formulaciones de CoQ (tanto en su forma oxidada como reducida), incluyendo polvo cristalino, emulsiones de aceite, solubilizados y formulaciones de nanopartículas [Villalba, 2010]. La biodisponibilidad de la forma cristalina de la CoQ es baja debido a su pobre solubilidad y alto peso molecular; por tanto, a nivel terapéutico se recomienda utilizar formulaciones solubilizadas más que aquéllas basadas en polvo, ya que las primeras presentan una mejor respuesta plasmática y, por tanto, potencialmente una mayor biodisponibilidad [Hargreaves, 2014].

Tal y como se ha indicado anteriormente, las deficiencias primarias de CoQ no deben ser tratadas con análogos de cadena corta de la ubiquinona tales como la idebenona, ya que éstos son buenos antioxidantes pero no pueden reemplazar al CoQ en la MRC bajo condiciones de depleción de la CoQ [Orsucci, 2011].

Por último, recientemente se han propuesto nuevas aproximaciones terapéuticas para las deficiencias de CoQ. En este sentido, se ha reportado que el probucol, un fármaco antioxidante e hipolipemiante, tiene efectos beneficiosos en ratones mutantes *Pdss2*, pero no se dispone de resultados en otros defectos ni en humanos [Acosta, 2016]. También se han propuesto algunos análogos del 4-HB como potenciales moléculas de baipás con mayor biodisponibilidad que la CoQ. Estos precursores del anillo de benzoquinona son solubles en agua y restaurarían la síntesis endógena de CoQ al sortear las etapas enzimáticas interrumpidas por mutaciones en genes *COQ*, aunque su eficacia puede variar dependiendo de la estabilidad del complejo biosintético de la CoQ. Esta aproximación es particularmente interesante dado que se trata de compuestos no tóxicos, que tienen buena biodisponibilidad y que podrían cruzar la barrera hematoencefálica. Algunos ejemplos son el ácido vanílico (VA) y el 3,4-dihidroxibenzoato (3,4-dHB), que son capaces de sortear las mutaciones en *COQ6* (**Figura 6**) [Acosta, 2019].

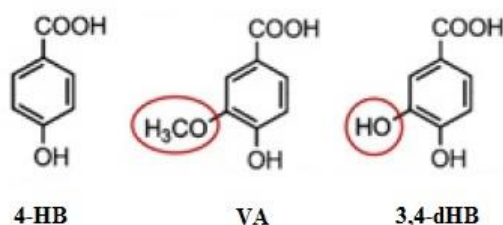


Figura 6. Estructuras químicas del 4-hidroxibenzoato (4-HB) y dos análogos, ácido vanílico (VA) y 3,4-dihidroxibenzoato (3,4-dHB), compuestos que podrían ser utilizados para sortear las etapas enzimáticas interrumpidas por mutaciones en *COQ6*. Adaptada de [Alcázar-Fabra, 2018].

3. Biomarcadores en enfermedades mitocondriales

El metabolismo mitocondrial es probablemente el más complejo dentro del metabolismo celular. Esta complejidad se explica en parte por el doble origen genético que controla el sistema OXPHOS, en el que las proteínas son codificadas tanto por el genoma nuclear como el mitocondrial, y por las vías metabólicas esenciales que tienen lugar en la mitocondria [Rahman, 2018; Zeviani, 2022]. De esta manera, no es de extrañar que los mecanismos fisiopatológicos de las EM sean muy heterogéneos, y que tanto el diagnóstico como la monitorización del tratamiento de estas enfermedades supongan todo un desafío para los profesionales sanitarios e investigadores que trabajan en este campo [Gorman, 2016; Parikh, 2017; Koene, 2018]. Este grupo incluye a los profesionales del laboratorio clínico, debido a la falta de especificidad y sensibilidad de los biomarcadores disponibles actualmente tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de los pacientes con EM [Haas, 2007; Gorman, 2016; Mancuso, 2017].

Para poder comprender mejor la complejidad de las EM y la dificultad asociada al desarrollo y validación de biomarcadores de laboratorio que sean específicos y sensibles, es importante conocer los diferentes tipos de EM y cómo afectan a las funciones del sistema OXPHOS [Gorman, 2016; Frazier, 2019; Stenton, 2020]. La frontera entre las EM definidas de forma tradicional y otras enfermedades causadas por mutaciones en genes mitocondriales es difusa, dado que a día de hoy la base de datos MitoCarta3.0 contiene 1.136 genes [Rath, 2021] pero sólo aproximadamente unos 450 están relacionados con patología en humanos [Stenton, 2020]. Por ejemplo, tradicionalmente los defectos de la beta-oxidación de los ácidos grasos no eran considerados como EM, pero lo cierto es que pueden afectar de forma considerable al metabolismo energético y las funciones OXPHOS. Probablemente, la diferencia más importante entre estos defectos de la beta-oxidación y otras EM es que los primeros tienen biomarcadores que son tan específicos (como es el perfil de acilcarnitinas) que incluso algunos de estos defectos forman parte de los programas de cribado neonatal [Vianey-Saban, 1997; Kompare, 2008]. Además, y más importante aún, muchas de estas enfermedades son tratables, lo cual supone una diferencia clave con la mayoría de otras EM, para las que no se dispone de opciones terapéuticas. Como han reportado previamente diversos autores, los genes cuyas mutaciones afectan a las funciones del sistema OXPHOS pueden clasificarse en dos grandes grupos: 1) genes con funciones relacionadas directamente con la OXPHOS, y 2) genes que afectan de forma secundaria a la OXPHOS y que también implican a otras vías metabólicas [Frazier, 2019]. Por otro lado, las mutaciones en estos genes alteran diferentes rutas biológicas que pueden clasificarse en seis categorías principales [Stenton, 2020]:

- 1) Síntesis de subunidades, factores de ensamblaje y transportadores de electrones de la OXPHOS.
- 2) Mantenimiento de la expresión y traducción del mtDNA.

- 3) Dinámica, homeostasis y control de calidad mitocondriales.
- 4) Metabolismo de sustratos.
- 5) Metabolismo de cofactores.
- 6) Metabolismo de compuestos tóxicos.

Las alteraciones de esas rutas biológicas tienen diferentes consecuencias en el metabolismo celular, algunas de las cuales todavía son desconocidas, y pueden resumirse en cinco categorías que están íntimamente relacionadas con los mecanismos fisiopatológicos fundamentales de las EM [Rahman, 2018; Frazier, 2019]:

- 1) Disminución de la síntesis de energía en forma de ATP, que puede afectar de forma secundaria a rutas de señalización celular.
- 2) Alteraciones del potencial de membrana mitocondrial que pueden afectar, por ejemplo, a la morfología mitocondrial o a los mecanismos de apoptosis.
- 3) Generación de ROS con daño oxidativo secundario a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (siendo el mtDNA especialmente sensible al estrés oxidativo).
- 4) Alteración del equilibrio de los dinucleótidos de nicotinamida adenina (NADH/NAD⁺) y flavina adenina (FADH₂/FAD) que puede conducir a una acidosis metabólica o alterar la biogénesis mitocondrial. Este mecanismo específico es responsable de la mayoría de las alteraciones bioquímicas que se observan en fluidos biológicos y que se han utilizado tradicionalmente como biomarcadores subrogados de las EM, tales como hiperlactacidemia, hiperalaninemia, y acumulación de acilcarnitinas e intermediarios del ciclo de Krebs (**Figura 7**).
- 5) Alteración del equilibrio de metabolitos intermedios que pueden producir cambios epigenéticos y mecanismos tóxicos o que pueden afectar a las redes de señalización celular que son dependientes del balance de nutrientes.

Estos aspectos fisiopatológicos generales son muy relevantes dado que tienen relación directa con las alteraciones bioquímicas que pueden emplearse como biomarcadores subrogados de las EM. Dado que los aminoácidos, carbohidratos y ácidos grasos son finalmente catabolizados dentro de la mitocondria, los metabolitos resultantes de estas rutas pueden acumularse cuando hay presente un defecto de la OXPHOS (**Figura 7**) [Garg, 2017]. Sin embargo, ni las especificidades ni sensibilidades de estos biomarcadores son iguales cuando los comparamos con las de otros errores congénitos del metabolismo (ECM) [Saudubray, 2022]. Además, algunas enfermedades comunes y ciertas condiciones ambientales (siendo la más común la privación de oxígeno) también pueden alterar estos biomarcadores e imitar fenotipos bioquímicos propios de las EM.

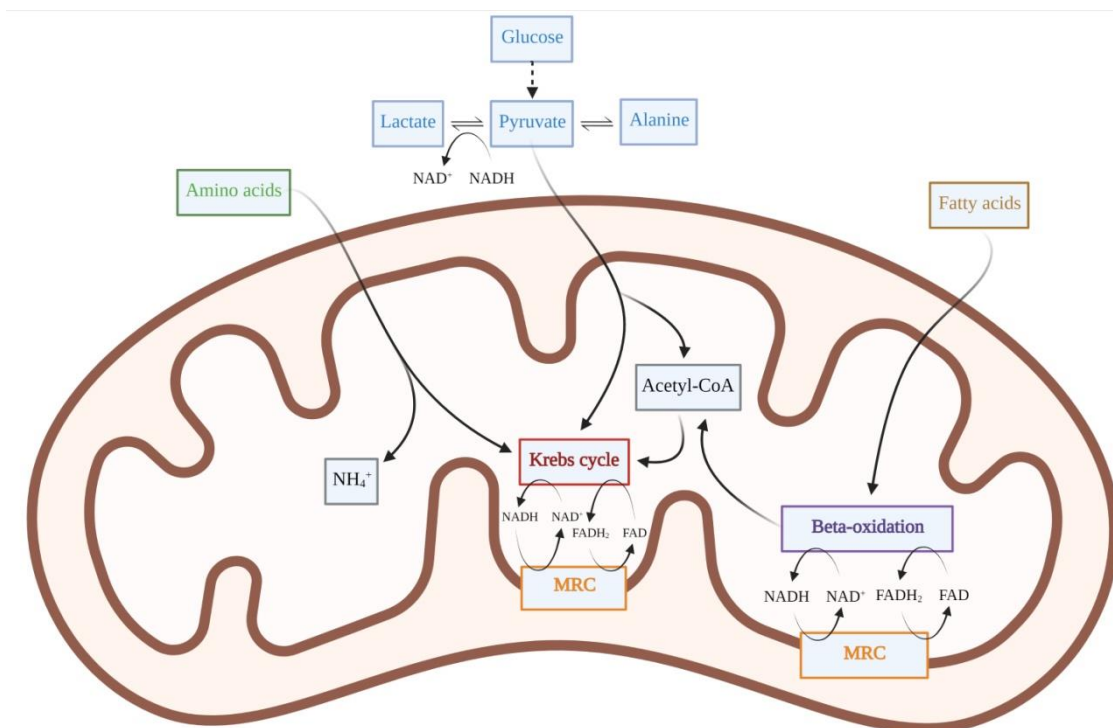


Figura 7. Visión general de las principales rutas metabólicas que tienen lugar en la mitocondria (catabolismo de aminoácidos, carbohidratos y ácidos grasos). El desequilibrio en la ratio NADH/NAD^+ es un mecanismo frecuente que conduce a un incremento de las concentraciones de algunos biomarcadores en diversos fluidos biológicos. Abreviaturas: FADH_2/FAD : dinucleótidos de flavina adenina; NADH/NAD^+ : dinucleótidos de nicotinamida adenina.

Creada con BioRender.com.

La llegada de las técnicas ‘ómicas’ (principalmente, las técnicas de NGS) ha revolucionado el escenario diagnóstico de las EM, como también ha ocurrido para otros ECM [Stenton, 2020; Yépez, 2022]. La identificación de nuevos genotipos y fenotipos ha incrementado considerablemente el número de pacientes identificados, siendo probablemente las EM el grupo de ECM más frecuente, con una prevalencia calculada de al menos 1:5.000 individuos, aunque la cifra podría estar infraestimada [Schaefer, 2004; Gorman, 2016]. A pesar de estos avances, se conoce que incluso con la aplicación de las técnicas NGS, aproximadamente el 50% de los pacientes con sospecha de EM permanece sin diagnóstico [Gorman, 2016; Frazier, 2019; Stenton, 2020]. Por ello, es necesario estudiar a los pacientes mediante distintas aproximaciones, que actualmente consisten en algoritmos diagnósticos que combinan datos clínicos, bioquímicos y radiológicos para clasificar a los pacientes como ‘diagnóstico posible’, ‘diagnóstico probable’ o ‘diagnóstico definitivo’ [Witters, 2018]. Esta clasificación basada en puntuaciones ejemplifica bien las dificultades reales que tienen lugar en el proceso diagnóstico

de las EM, en el que los biomarcadores, a pesar de sus limitaciones, todavía juegan un papel crucial, especialmente cuando no se detectan mutaciones o cuando se detectan VUS.

En la práctica clínica disponemos de biomarcadores bien conocidos en sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR) que actúan como marcadores subrogados de las EM. El análisis de lactato, piruvato, aminoácidos, ácidos orgánicos, acilcarnitinas y vitaminas (como, por ejemplo, la tiamina) se lleva a cabo de forma rutinaria en los laboratorios dedicados al estudio de los pacientes con EM. Sin embargo, como ya se ha dicho, muchos de estos biomarcadores carecen de buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes [Haas, 2007; Gorman, 2016; Garg, 2017; Mancuso, 2017]. De esta forma, uno de los desafíos principales actuales en el campo de las EM consiste en la validación de biomarcadores específicos y sensibles tanto para el diagnóstico como para predecir la progresión de la enfermedad. En la última década se han identificado nuevos biomarcadores con mayor especificidad diagnóstica, incluyendo algunas proteínas como las citoquinas FGF-21 (factor de crecimiento de fibroblastos-21) y GDF-15 (factor de diferenciación del crecimiento-15) o la isoforma plasmática de la gelsolina [Suomalainen, 2011; Kalko, 2014; Peñas, 2021], o el ADN mitocondrial libre circulante (ccf-mtDNA) en plasma [Maresca, 2020], que también se han propuesto como biomarcadores potencialmente útiles para evaluar la evolución clínica de los pacientes. A pesar de estos avances, también son necesarios nuevos biomarcadores de progresión de la enfermedad que permitan, por ejemplo, monitorizar el éxito de las nuevas estrategias terapéuticas [Mancuso, 2017].

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral ha sido progresar en el desarrollo de biomarcadores para el estudio de pacientes con enfermedades mitocondriales.

Los objetivos concretos han sido los siguientes:

1. Investigar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y la investigación de enfermedades mitocondriales causadas por defectos OXPHOS: análisis de ADN mitocondrial libre circulante en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedades mitocondriales.
2. Analizar la concentración de coenzima Q₁₀ en diferentes muestras biológicas con fines diagnósticos y de monitorización del tratamiento: determinación de coenzima Q₁₀ en plasma, músculo, fibroblastos, orina, plaquetas y células mononucleares.
3. Desarrollar y validar un nuevo procedimiento para analizar las concentraciones de coenzima Q₁₀ en plasma de pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial, para su posterior aplicación en otros especímenes biológicos para el diagnóstico de deficiencias de coenzima Q₁₀.

PUBLICACIONES

Capítulo 1: Investigar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y la investigación de enfermedades mitocondriales causadas por defectos OXPHOS: análisis de ADN mitocondrial libre circulante en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedades mitocondriales.

Publicación 1

Título: *Circulating cell-free mitochondrial DNA in cerebrospinal fluid as a biomarker for mitochondrial diseases*

Autores: Selen Trifunov ^{a,*}, Abraham J. Paredes-Fuentes ^{b,*}, Carmen Badosa ^a, Anna Codina ^a, Julio Montoya ^{c,d}, Eduardo Ruiz-Pesini ^{c,d}, Cristina Jou ^{a,c,e}, Glòria Garrabou ^{c,f}, Josep M. Grau-Junyent ^{c,f}, Dèlia Yubero ^g, Raquel Montero ^b, Jordi Muchart ^h, Juan D. Ortigoza-Escobar ⁱ, Maria M. O’Callaghan ⁱ, Andrés Nascimento ^a, Albert Català ^{c,j}, Àngels Garcia-Cazorla ⁱ, Cecilia Jimenez-Mallebrera ^{a,c} and Rafael Artuch ^{a,c}

^a Neuromuscular Unit, Department of Neuropediatrics, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^b Department of Clinical Biochemistry, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^c Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute for Health Research of Aragón (IIS Aragón), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; ^e Department of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^f Department of Internal Medicine, Laboratory of Muscle Research and Mitochondrial Function—Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Faculty of Medicine and Health Science, University of Barcelona (UB), Hospital Clínic of Barcelona (HCB), Barcelona, Spain; ^g Department of Genetics and Molecular Medicine, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^h Department of Radiology, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ⁱ Department of Child Neurology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^j Department of Hematology, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. * Primeros coautores.

Referencia: Clinical Chemistry. 2021 Aug 5;67(8):1113-1121. doi: 10.1093/clinchem/hvab091

Circulating Cell-Free Mitochondrial DNA in Cerebrospinal Fluid as a Biomarker for Mitochondrial Diseases

Selena Trifunov,^{a,†} Abraham J. Paredes-Fuentes,^{b,†} Carmen Badosa,^a Anna Codina,^a Julio Montoya,^{c,d} Eduardo Ruiz-Pesini,^{c,d} Cristina Jou,^{a,c,e} Glòria Garrabou,^{c,f} Josep M. Grau-Junyent,^{c,f} Dèlia Yubero,^g Raquel Montero,^b Jordi Muchart,^h Juan D. Ortigoza-Escobar,ⁱ Maria M. O'Callaghan,ⁱ Andrés Nascimento,^a Albert Català,^{c,j} Àngels Garcia-Cazorla,ⁱ Cecilia Jimenez-Mallebrera,^{a,c,†} and Rafael Artuch^{a,c,†,*}

BACKGROUND: Mitochondrial diseases (MD) are genetic metabolic disorders that impair normal mitochondrial structure or function. The aim of this study was to investigate the status of circulating cell-free mitochondrial DNA (ccfmdtDNA) in cerebrospinal fluid (CSF), together with other biomarkers (growth differentiation factor-15 [GDF-15], alanine, and lactate), in a cohort of 25 patients with a molecular diagnosis of MD.

METHODS: Measurement of ccfmdtDNA was performed by using droplet digital PCR.

RESULTS: The mean copy number of ccfmdtDNA was approximately 6 times higher in the MD cohort compared to the control group; patients with mitochondrial deletion and depletion syndromes (MDD) had the higher levels. We also detected the presence of both wild-type mtDNA and mtDNA deletions in CSF samples of patients with single deletions. Patients with MDD with single deletions had significantly higher concentrations of GDF-15 in CSF than controls, whereas patients with point mutations in mitochondrial DNA presented no statistically significant differences. Additionally, we found a significant positive correlation between ccfmdtDNA levels and GDF-15 concentrations ($r = 0.59$, $P = 0.016$).

CONCLUSION: CSF ccfmdtDNA levels are significantly higher in patients with MD in comparison to controls

and, thus, they can be used as a novel biomarker for MD research. Our results could also be valuable to support the clinical outcome assessment of MD patients.

Introduction

Mitochondrial diseases (MD) are genetic disorders that impair mitochondrial structure or function leading, among other disturbances, to decreased biosynthesis of ATP by the oxidative phosphorylation (OXPHOS) pathway. MD are the most frequent group of inborn errors of metabolism, affecting at least 1 in 5000 individuals (1). The origin of MD is bigenomic, as they can arise due to mutations in either mitochondrial DNA (mtDNA) or nuclear DNA (nDNA) genes. MD can present at any age, and they can be multisystemic or organ-specific (2). Moreover, patients can present with a well-defined syndrome or a collection of multisystemic signs and symptoms.

The complexity of diagnosing MD is due to multiple factors, including heteroplasmy of mtDNA, heterogeneous manifestations of symptoms, and lack of biomarkers. Most routine biomarkers (e.g., lactate, pyruvate, alanine, or urinary organic acids) show poor sensitivity and specificity. Recently, it has been reported that growth differentiation factor-15 (GDF-15) and fibroblast growth factor-21 (FGF-21) can improve diagnostic specificity of MD (3). With the advances in

^aNeuromuscular Unit, Department of Neuropediatrics, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^bDepartment of Clinical Biochemistry, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^cBiomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ^dDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Institute for Health Research of Aragón (IIS Aragón), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; ^eDepartment of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^fDepartment of Internal Medicine, Laboratory of Muscle Research and Mitochondrial Function—Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Faculty of Medicine and Health Science, University of Barcelona (UB), Hospital Clinic of Barcelona (HCB), Barcelona, Spain; ^gDepartment of Genetics and Molecular Medicine, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^hDepartment of Radiology, Institut de Recerca Sant

Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ⁱDepartment of Child Neurology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ^jDepartment of Hematology, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.

*Address correspondence to this author at: Clinical Biochemistry Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain. e-mail: rartuch@sjdhospitalbarcelona.org.

[†]These authors contributed equally to this work as first authors.

[‡]These authors share the senior position.

Received November 9, 2020; accepted May 5, 2021

DOI: 10.1093/clinchem/hvab091

next-generation sequencing (NGS) and the discovery of a variety of new disease-specific genes, the ability to diagnose MD has improved enormously (4). However, many patients with suspected MD remain without a genetic diagnosis, presenting a challenge for clinicians to counsel and manage them (5). Biomarkers for clinical-outcome research are lacking as well.

Mitochondrial deletion and depletion syndromes (MDD) are a group of disorders in which the quality and quantity of the mtDNA is disturbed. mtDNA deletions are divided into single large-scale deletions or multiple mtDNA deletions. The first group includes sporadic, somatic mutational events that occur during early embryonic development and typically present in early childhood, such as Pearson and Kearns-Sayre (KSS) syndromes (6). The second group includes deletions that accumulate somatically in postmitotic tissues secondary to mutations in nuclear genes that are directly involved in mtDNA replication, the nucleotide pool balance, or mitochondrial dynamics (7).

Traditionally, mitochondria and mtDNA were considered as intracellular structures. The discovery of circulating cell-free mitochondrial DNA (ccfmdtDNA) drew increased attention in the biomarkers field (8). Mostly, ccfmdtDNA has been studied in plasma samples as a biomarker that is increased in conditions such as necrosis, apoptosis, tumors, or inflammation (9). Recently, it has been reported that longitudinal assessment in patients with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes syndrome (MELAS) showed increased levels of plasma ccfmdtDNA in relation to acute events or progression of neurodegeneration (10). Using cerebrospinal fluid (CSF), only a few studies have reported decreased ccfmdtDNA levels in neurodegenerative conditions (e.g., Alzheimer disease, Parkinson disease) or increased levels in neuroinflammatory diseases (e.g., HIV and anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis) (11). The origin and the mechanism of ccfmdtDNA secretion into biological fluids remain a matter of debate. It is assumed that in CSF, ccfmdtDNA originates from the choroid plexus (CP) ependymal cells. A simplistic explanation of the ccfmdtDNA origin is probably mechanical injury to the cell that occurs in response to trauma (12). Cell death or increased oxidative or metabolic stress can also trigger the release of ccfmdtDNA as a damage-associated molecular pattern (DAMP) (13, 14). This, however, leads to certain confusion as one would expect to find high levels of ccfmdtDNA in neurodegenerative disorders, which have progressive neuronal cell death as a hallmark, but opposite results have been reported (15, 16).

It is known that the quantity and quality of intracellular mtDNA are perturbed in MD. However, it is yet unknown if primary mitochondrial dysfunction can be associated with CSF ccfmdtDNA levels in

MD patients. Our aim was to investigate the status of ccfmdtDNA in CSF, together with other biomarkers such as GDF-15, in a cohort of patients with a molecular diagnosis of MD.

Materials and Methods

PATIENTS AND CONTROLS

The inclusion criteria for the 25 patients enrolled in this study were: 1) having a molecular diagnosis of MD, and 2) the availability of the CSF samples. The parameters of age, sex, clinical phenotype, and genetic diagnosis for each patient are shown in Table 1 (mean age: 12 years, standard deviation [SD]: 14.12, range: 0.25–63 years old). Patients 3 and 6 were indeed the same patient, whose pathology progressed from a Pearson syndrome when he was 1-year-old (patient 3) to a Pearson syndrome with psychomotor retardation, tubulopathy, and impaired electroencephalogram (EEG) when he was 8 (patient 6). Only 3 patients of our cohort were not pediatric: patients 7 and 17, who had KSS, and patient 8, who had the mildest phenotype (chronic progressive external ophthalmoplegia [CPEO], Table 1). We also analyzed samples from 20 control subjects (mean age: 4.5 years old, SD: 8.96, range: 0.02–34 years old) (Supplemental Table 1), which were collected at the emergency department mainly because of suspicion of meningitis and encephalitis. All samples were obtained by lumbar puncture. An aliquot was used for routine biochemical measurements, cell count, and microbiological investigations. The remaining volume was centrifuged (2,000 g, 4 °C, 10 min) to collect the clear supernatant, which was aliquoted and immediately stored at –80 °C at the Biobanc de l'Hospital Infantil Sant Joan de Déu until further analysis. Exclusion criteria were: presence of viral or bacterial meningitis, traumatic or tumoral disorders of the CNS, intracerebral hemorrhage, CSF blood contamination, and pleocytosis (17).

ETHICS STATEMENT

All participants gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Sant Joan de Déu (reference PIC-149-17) and it was conducted in accordance with the guidelines established in the WMA Declaration of Helsinki.

DROPLET DIGITAL PCR (DDPCR)

All reagents, consumables, and instruments were provided by Bio-Rad Laboratories. Primers and probes sequences used in this study are listed in Supplemental Table 2.

The 20 µL reactions consisted of 5 µL of CSF samples, 1X of ddPCR supermix for probes (no dUTP),

ccfmdtDNA in CSF as Biomarker for MD

Patient	Age (years)	Sex	Clinical phenotype	Brain MRI	Genetic diagnosis	ccfmdtDNA (copies/ μ L)	GDF-15 (pg/mL)
1	8	M	Leigh syndrome	BG	<i>MT-ATP6</i> : m.9176T>C	25.1	n.a.
2	11	M	MERRF syndrome	Normal	<i>MT-TK</i> : m.8344A>G	26.9	78.1
3	1	M	Pearson syndrome	Normal	mtDNA deletion	9.70	n.a.
4	13	F	NARP syndrome	GM	<i>MT-ATP6</i> : m.8993T>G	3.17	93.8
5	10	M	Leigh syndrome, ataxia	BG	<i>PDHB</i> : c.[301A>G]; [42+1G>A]	12.8	43.4
6	8	M	Pearson syndrome, PMR, tubulopathy	WM	mtDNA deletion	91.2	6338
7	35	F	KSS	n.a.	mtDNA deletion	319	6491
8	63	M	CPEO	n.a.	mtDNA deletion	18.1	798
9	14	M	KSS	GM	mtDNA deletion	23.2	n.a.
10	3	F	Leigh syndrome	BG	<i>MT-ND3</i> : m.10197G>A	8.03	24.7
11	1	M	Pearson syndrome, fatigue, ptosis	WM	mtDNA deletion	32.4	47.1
12	7	F	Leigh syndrome	BG	<i>PDHA1</i> : c.[409G>C];[409=]	16.2	n.a.
13	16	M	Leigh syndrome	BG	<i>SLC19A3</i> : c.[74dupT]; [980-14A>G]	32.2	52.2
14	7	M	KSS	WM	mtDNA deletion	113	n.a.
15	0.25	F	Encephalopathy, epilepsy, tetraparesis	WM	<i>GFM1</i> : c.[1401delA]; [2011C>T]	138	143
16	13	M	Epilepsy, myopathy	Normal	<i>MT-TL1</i> : m.3243A>G	30.2	257
17	34	F	KSS	WM	mtDNA deletion	37.7	4028
18	1	M	Encephalopathy, epilepsy	n.a.	<i>POLG</i> : c.[911T>G]; [2663G>A]	55.5	n.a.
19	9	F	KSS	Normal	mtDNA deletion	37.3	4955
20	22	M	KSS	WM	mtDNA deletion	70.4	6645
21	7	M	Leigh syndrome, ataxia	BG	<i>PDHA1</i> : c.[832G>A];[0]	13.8	67.5
22	1	F	Encephalopathy, epilepsy	n.a.	<i>DNM1L</i> : c.[1337G>T]; [1337=]	228	n.a.
23	13	F	Myopathy, PMR	n.a.	<i>MT-TA</i> : m.5624T>C	22.5	n.a.
24	2	F	Leigh syndrome	BG	<i>MT-ATP6</i> : m.8993T>G	94.8	58.5
25	1	M	Leigh syndrome	BG	<i>SLC19A3</i> : c.[1079dupT]; [980-14A>G]	66.8	n.a.
Values (range) for controls (Supplemental Table 1):						1.0–31.3	33.0–417

Values for ccfmdtDNA represent mean values calculated from multiple measurements. Patients 3 and 6 were the same patient whose samples were taken at different stages of his life. Abbreviations: BG, basal ganglia involvement; CPEO, chronic progressive external ophthalmoplegia; F, female; GM, gray matter involvement; KSS, Kearns Sayre syndrome; M, male; MERRF, myoclonic epilepsy with ragged-red fibers; n.a., not available; NARP, neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa; PMR, psychomotor retardation; WM: white matter disturbances

250 nmol/L of ND1 probe, 500 nmol/L of ND1 primers, 125 nmol/L of ND4 (or B2M or BAX) probe, 250 nmol/L of ND4 (or B2M or BAX) primers, and nuclease-free water, as previously reported (18, 19). Reactions were transferred to ddPCR 96-well plates.

Droplet generation was carried out manually using a QXDx droplet generator. For this purpose, 70 μ L of droplet generation oil was added to each sample, and DG8 cartridges and DG8 gaskets were used for QX200/QX100 droplet generator. Droplets were transferred to

96-well plates and then sealed for amplification. PCR reactions were carried out in a C1000 touch thermal cycler using standard cycling conditions: 95 °C for 10 min, 40 cycles of 94 °C for 30 s, and 60 °C for 1 min, and then 98 °C for 10 min. Following PCR amplification, droplets were read on a QX200 droplet reader, and ddPCR data were analyzed using QuantaSoft software version 1.7.

All experiments were performed at least in duplicate and each sample was assessed, at least, in triplicate. Only samples that exhibited more than 10 000 droplets were included in the analysis. The simultaneous measurement of ccfmtDNA and *B2M* confirmed that no samples were contaminated with genomic DNA but one (which was excluded from the study), as we did not detect the presence of one or more copies of the nuclear gene per microliter of CSF (Supplemental Table 3) (16, 18). We also assessed the contribution of cell-free nDNA in samples using a shorter amplicon assay (*BAX*) (Supplemental Table 3). Additionally, we quantified the total level of mtDNA deletions within a sample by comparing specific amplification of 2 mitochondrial genes (20); the main premise of this assay relies on the fact that the majority of mtDNA deletions reported remove the *MTND4* gene, whilst *MTND1* remains even in the deleted molecule (Supplemental Fig. 1) (21, 22). The number of mtDNA wild-type molecules (WT) was calculated by dividing the total number of copies per microliter of CSF of ND4 positive droplets by the total number of copies per microliter of CSF of ND1 positive droplets, and the percentages of mtDNA deletions were obtained as 1-WT. Examples of one-dimensional

ddPCR plots of a MD patient (patient 13) and a control (control 6) are depicted in Fig. 1, A and B. An example of a 2-dimensional ddPCR plot of a MD patient (patient 13) positive for the presence of mtDNA deletions is also depicted in Fig. 1, C.

BIOCHEMICAL ANALYSES

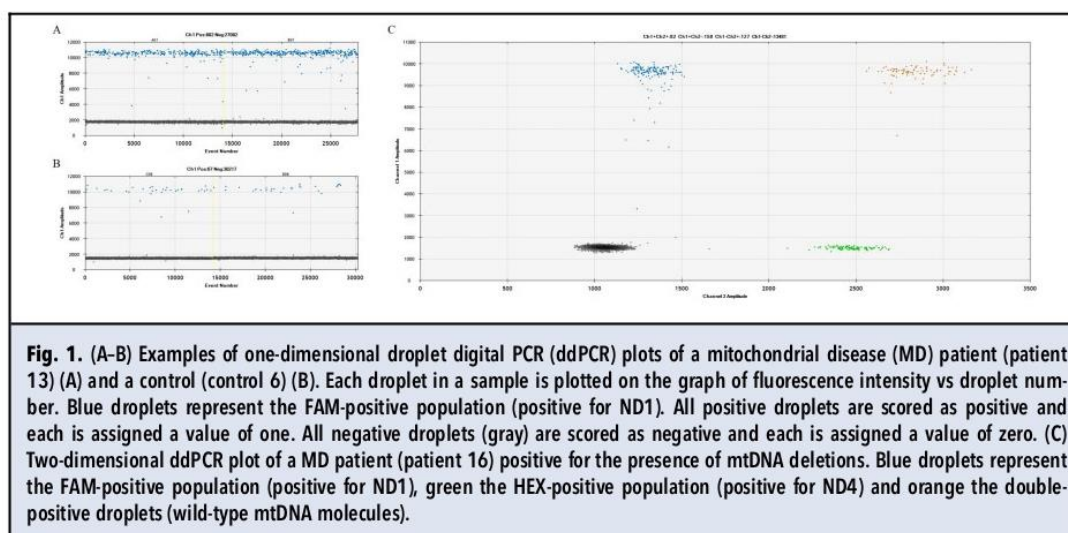
GDF-15 concentrations were quantified in CSF samples using Human GDF-15 Quantikine[®] ELISA kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions. CSF amino acids (including alanine) were analyzed by ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled to tandem mass spectrometry detection (UPLC-MS/MS) in a Waters Xevo TQD system, as previously reported (23). CSF lactate and total protein values were analyzed by using an automated spectrophotometric procedure in an Architect autoanalyzer (Abbott Laboratories).

NEUROIMAGING

Brain MRI examination included T1 and T2-weighted images and, when available, diffusion-weighted images, magnetic resonance spectroscopy, and fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) (1.5 T Signa EchoSpeed System, GE Healthcare).

STATISTICAL ANALYSES

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.2.0 for Windows, (GraphPad Software). The Mann-Whitney sum test was used to compare ccfmtDNA copy numbers, mtDNA deletions, and GDF-15 concentrations between groups. Spearman



ccfmtDNA in CSF as Biomarker for MD

rank correlation was applied to correlate ccfmtDNA, GDF-15, lactate, alanine, total protein levels, *B2M* and *BAX* copy numbers. A P -value ≤ 0.05 was considered significant.

Results

CCFMTDNA COPY NUMBER ASSESSMENT IN CSF OF MD PATIENTS AND CONTROLS

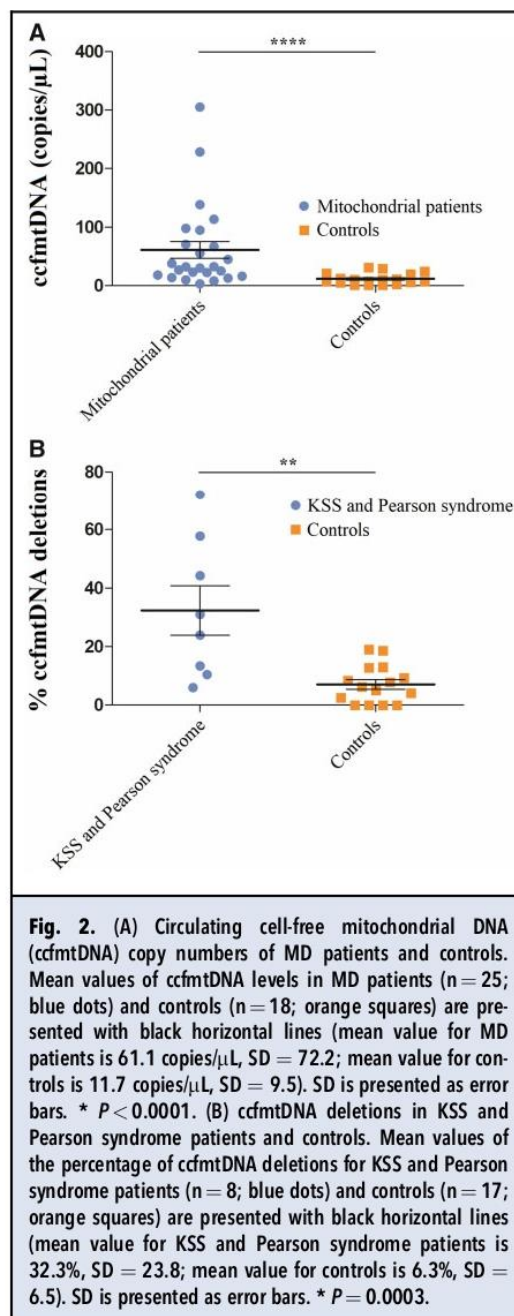
We compared absolute CSF ccfmtDNA copy numbers in MD patients and controls, and our results showed that the ccfmtDNA levels were significantly higher in the MD group ($P < 0.0001$). Mean ccfmtDNA copy numbers were approximately 6 times higher in MD patients when compared to controls (Table 1, Supplemental Table 1). In the control group, ccfmtDNA values ranged from 1.0 to 31.3 copies/ μ L (mean = 11.7 copies/ μ L), whereas for MD patients, it ranged from 3.2 to 319 copies/ μ L (mean = 61.1 copies/ μ L) (Fig. 2, A).

CCFMTDNA COPY NUMBERS IN DIFFERENT GROUPS OF MD PATIENTS

We observed differences in the CSF ccfmtDNA levels among our cohort of MD patients (Table 1, Fig. 3). To better comprehend the significance of varied ccfmtDNA levels, we divided the MD cohort into 4 different groups depending on their mean ccfmtDNA copy numbers. Patients with MDD caused by nuclear gene mutations (mutations in *POLG*, *DNM1L*, and *GFM1*) had mean ccfmtDNA levels of 149 copies/ μ L. The group of MDD with single deletions in mtDNA (KSS and Pearson syndromes) had a mean value of 82 copies/ μ L. Finally, the 2 groups with the lowest mean values of ccfmtDNA were: 1) patients with point mutations in mitochondrial genes (*MT-ATP6*, *MT-ND3*, *MT-TA*, *MT-TL1*, and *MT-TK*), having a mean value of 35.5 copies/ μ L, and 2) patients with mutations in nuclear genes involved in energy metabolism (*PDHA1*, *PDHB*, and *SLC19A3*), with a mean value of 29 copies/ μ L (Fig. 3). Interestingly, we were able to compare 2 samples from 1 patient at 2 different stages: 1) at age 1, when he presented a Pearson syndrome phenotype, and 2) at age 8, when it progressed to Pearson syndrome with psychomotor retardation, tubulopathy, and impaired EEG (Table 1). This comparison between the 2 samples showed an increase in the ccfmtDNA copy number from 9.7 copies/ μ L to 91.2 copies/ μ L.

CCFMTDNA INTEGRITY MEASUREMENT

As our MD cohort comprised of a group of patients with MDD due to nuclear gene mutations and single deletions in mtDNA, we tested if mtDNA deletion



heteroplasmy was present in CSF ccfmtDNA. In our control cohort, we analyzed 17 samples; only 4 of them were considered as positive for mtDNA heteroplasmy (cut-off value $>10\%$), with values ranging between

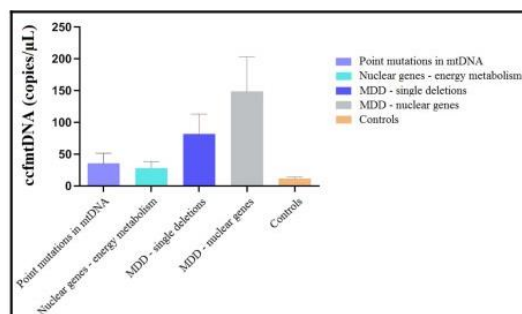


Fig. 3. ccfmtDNA copy numbers in different groups of MD patients and controls. Violet bar represents MD patients with point mutations in mitochondrial genes ($n = 10$; mean = 35.5 copies/ μL , SD = 34.3); turquoise bar represents MD with mutations in nuclear genes involved in energy metabolism ($n = 4$, mean = 29 copies/ μL , SD = 7.1); deep blue bar represents mitochondrial deletion and depletion syndromes (MDD) with single deletions in mtDNA ($n = 10$; mean = 82 copies/ μL , SD = 98.9); light gray bar represents MDD with nuclear gene mutations ($n = 3$; mean = 149 copies/ μL , SD = 94.3); yellow bar represents controls ($n = 18$; mean = 11.7 copies/ μL , SD = 9.5). SD is presented in the form of error bars.

10–20% (Fig. 2, B, Supplemental Table 1). Twelve out of the 25 MD patients showed more than 10% of mtDNA heteroplasmy (mean percentage = 33.6%). Eight of them presented with KSS or Pearson syndrome (mean percentage = 34.9%) (Fig. 2, B, Supplemental Table 4), while the other 4 patients presented different heteroplasmy percentages: patients 1 and 4 (*MT-ATP6* mutations), 12 and 13.3%, respectively; patient 5 (*PDHB* mutations), 20.6%; and patient 15 (*GFMI* mutations), 33.7%.

CSF GDF-15 CONCENTRATIONS CORRELATE WITH CCFMTDNA COPY NUMBERS

We assessed GDF-15 concentrations in CSF for 16 MD patients and 15 controls (Table 1, Supplemental Table 1). The selection of the samples was based on the availability of the CSF sample for the analysis. The patients were categorized in 2 groups: 1) those harboring point mutations in mitochondrial genes, and 2) those with MDD with single deletions. When they were grouped together, no significant differences were observed with respect to controls. When the groups were examined separately, the group with single deletions showed significantly higher GDF-15 concentrations compared to controls (mean values: 4186 pg/mL and 153 pg/mL, respectively). The mean CSF GDF-15 value in MD patients with point mutations in mtDNA (84.5 pg/mL)

was not significantly different when compared to controls. We found a significant positive correlation between ccfmtDNA levels and GDF-15 concentrations ($r = 0.59$, $P = 0.016$). For routine biomarkers, Spearman correlation coefficients showed an association between ccfmtDNA and CSF total protein ($r = 0.39$, $P = 0.012$), but not with lactate and alanine levels (Supplemental Table 4). No significant associations could be demonstrated in the group of mitochondrial patients among ccfmtDNA and *B2M* and *BAX* copy numbers.

BRAIN MRI AND CCFMTDNA LEVELS

Brain MRI examinations were performed for 20 patients at the time that the lumbar puncture was conducted for CSF analysis. Patients were classified as having normal or impaired MRI (Table 1). Patients with impaired MRI were classified into 3 categories: white matter (WM), gray matter (supratentorial and at cerebellum) (GM), and basal ganglia involvement (BG). Four out of 20 patients displayed normal MRI results, and 3 of them showed normal ccfmtDNA levels. For the 16 patients with impaired MRI, the 2 cases with GM disturbances showed normal ccfmtDNA levels, whereas the 6 patients with WM disturbances (4 patients with KSS, 1 with Pearson syndrome evolving to KSS, and 1 who harbored a mutation in *GFMI*), and 3 out of 8 patients with BG showed increased ccfmtDNA copy numbers (2 patients who harbored a mutation in *SLC19A3* and 1 with neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa (NARP) syndrome).

Discussion

Recently, it was reported that cell-free nDNA and ccfmtDNA with different fragment lengths are differentially distributed in the CSF and serum of patients with brain-related disorders, such as cerebral hemorrhage, brain trauma, intracranial hypertension, or fever (24). Interestingly, increased plasma levels of ccfmtDNA have been reported in a cohort of MELAS patients, suggesting that they may be used for monitoring the disease course (10). We report here that CSF ccfmtDNA levels are higher in MD patients in comparison to controls, and therefore, CSF ccfmtDNA content can be used as a biomarker to improve MD diagnosis and research. To the best of our knowledge, this is the first study to assess the CSF ccfmtDNA in MD. ccfmtDNA levels can be useful to further narrow the type of MD, as our results show that ccfmtDNA levels are especially high in MDD, irrespective of whether they result from nuclear or mitochondrial gene mutations. Moreover, moderately increased levels of ccfmtDNA seem to be associated with point mutations in mitochondrial genes coding for

ccfmtDNA in CSF as Biomarker for MD

tRNAs and subunits of the respiratory chain complexes, or even with mutations in nuclear genes involved in energy metabolism. The differences in the ccfmtDNA levels among these groups can be interpreted in light of the different pathomechanisms involved in MD. In MDD caused by nuclear gene mutations, the maintenance and stability of the mtDNA is defective, similar to the MDD with large single deletions in mtDNA, in which the defect is present early in the embryogenesis where it disrupts the integrity of the mtDNA molecules (25). On the contrary, the point mutations in nuclear genes analyzed in this study affect the energy metabolism and they can lead to deficiencies of cofactors, single respiratory complexes, or their assembly. Point mutations in mitochondrial genes primarily affect the energy production function leading to single/combined respiratory defects, or in case of tRNA mutations, affect mitochondrial protein synthesis, and secondarily disrupt entire mitochondrial homeostasis (26). However, the differences among the groups may be explained by the differences in heteroplasmy levels present in the cells generating CSF. Intriguingly, it was demonstrated that disrupting the mitochondrial membrane potential leads to mtDNA secretion from mitochondria to cytoplasm (14). CP epithelial cells secrete most of the CSF, and they may exhibit differential rate of heteroplasmy. Interestingly, the oncocyctic-like transformation of CP cells with high heteroplasmy rates of mutated mtDNA molecules is one of the hallmarks of KSS (27). However, to the best of our knowledge, it is not described in Pearson syndrome or in any of the syndromes associated with mutations in genes involved in mtDNA stability. We studied 2 samples from a patient with Pearson syndrome and the second sample, which was taken during the evolution to KSS, showed a marked increase in the ccfmtDNA levels. Since this was the only case where we procured 2 samples, we cannot be sure if this increase is connected with the progression of the neurological symptoms and/or CP failure, but it warrants further investigation. ccfmtDNA secretion in disorders that affect the stability of the intracellular mtDNA indicates that this is an active process. We hypothesize 2 scenarios to interpret this process. First, compensatory proliferation of mitochondria, as observed in ragged-red fibers in MDD (19), suggests that the additional increase in the intracellular mtDNA could activate mechanisms of mtDNA secretion outside the cell. The second possibility is that the cells release dysfunctional mitochondria. Other mechanisms such as increased oxidative stress, apoptosis, or increased inflammation could also explain these differences (13, 14). Since the source of ccfmtDNA or its specific cellular/tissue origin is largely unknown, we cannot rule out that

our data would represent CNS cellular turnover. However, the low levels of *BAX*, the absence of correlation between ccfmtDNA and *BAX* levels in the group of mitochondrial patients, and the lack of association between CNS damage assessed by MRI and the ccfmtDNA copy numbers, would suggest that the cell turnover would have a limited influence in our results.

Besides the increased copy numbers, we also showed presence of heteroplasmy in the ccfmtDNA as we detected the presence of both wild-type mtDNA and mtDNA deletions in CSF samples of patients with single mitochondrial deletions. This is an important finding because the presence of mtDNA deletions is traditionally assessed in muscle biopsy material as they are difficult to detect in blood, except in Pearson syndrome. The presence of intracellular mtDNA deletions in healthy infants and children has already been reported (28, 29) and the presence of mtDNA deletions in older healthy individuals is considered to be a consequence of aging (30). The mtDNA deletions of up to 10% are considered as natural variability (31). In 4 of our controls, we observed levels between 10% and 20%, thus it is possible that the variability of CSF ccfmtDNA is greater than intracellular mtDNA, and this cut-off value should be revisited in larger series of controls.

Diagnosis and research of MD remains challenging and there is a need for more sensitive and specific biomarkers that could contribute to easier categorization of these patients and prediction of clinical outcomes. From our experience, in patients with neurological symptoms and suspicion of MD, CSF is routinely collected and evaluation of biomarkers like ccfmtDNA could add great value to guide towards accurate diagnosis or to detect treatable conditions such as deep cerebral folate deficiency observed in KSS, POLG disease, and other MD (32).

In this study, CSF GDF-15 concentrations correlated with ccfmtDNA copy numbers, showing that CSF GDF-15 concentrations were particularly high in MDD patients with single mtDNA deletions. In KSS, the oncocyctic transformation of CP epithelium and an accumulation of deleted mtDNA molecules in these cells have been demonstrated. At the same time, the most prominent site of GDF-15 synthesis within the brain is the CP, secreting it into the CSF. Thus, the oncocyctic transformation of CP can be a plausible explanation for remarkably high GDF-15 concentrations in MDD with single deletions.

Regarding brain MRI and ccfmtDNA levels, data should be interpreted cautiously. Although all patients with WM disturbances presented with high CSF ccfmtDNA copies, all of them had MDD that probably would be the primary cause of the high ccfmtDNA

levels. In fact, there are neurological conditions, such as Creutzfeldt-Jakob disease, where a significant neuronal loss occurs without corresponding variations in mtDNA levels (11).

Some limitations of our study include the small size of the series of cases and that there are different disease-causing genes. Moreover, most of the CSF samples were collected when patients were already under treatment (cofactors and antioxidants) that could modify the ccfmtDNA levels, as has been suggested for Parkinson disease (8). However, our study outcomes highlight the significance of liquid biopsy, since CSF is the only biological sample available as surrogate specimen to study brain status. Thus, our results could have implications not only for diagnosis, but also for prognostic value and treatment follow-up studies.

In conclusion, CSF ccfmtDNA levels are significantly higher in MD patients in comparison to controls and, thus, they can be used as a novel biomarker for MD diagnosis and research. Our results could also be valuable to support the clinical outcome assessment of MD patients.

Supplemental Material

Supplemental material is available at *Clinical Chemistry* online.

Nonstandard Abbreviations: MD, mitochondrial diseases; ccfmtDNA, circulating cell-free mitochondrial DNA; CSF, cerebrospinal fluid; GDF-15, growth differentiation factor-15; MDD, mitochondrial deletion and depletion syndromes; OXPHOS, oxidative phosphorylation; mtDNA, mitochondrial DNA; nDNA, nuclear DNA; FGF-21, fibroblast growth factor-21; NGS, next-generation sequencing; KSS, Kearns-Sayre syndrome; MELAS, mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome; CP, choroid plexus; DAMP, damage-associated molecular pattern; CNS, central nervous system; EEG, electroencephalogram; WT, wild-type; CPEO, chronic progressive external ophthalmoplegia; ddPCR, droplet digital PCR; WM, white matter disturbances; GM, grey matter disturbances; BG, basal ganglia involvement; UPLC-MS/MS, ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry; FLAIR, fluid-attenuated inversion recovery; MERRF, myoclonic epilepsy with ragged-red fibers; NARP, neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa; PMR, psychomotor retardation

Human Genes: POLG, DNM1L, GFM1 (nuclear genes); MT-ATP6, MT-ND3, MT-TA, MT-TL1, MT-TK (mitochondrial genes), PDHA1, PDHB, SLC19A3, (nuclear genes in energy metabolism)

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 4 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; (c) final approval of the published article; and (d) agreement to be accountable for all aspects of the article thus ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the article are appropriately investigated and resolved.

R. Artuch was responsible for conceptualization, supervision, funding acquisition, and writing the original draft of the manuscript; C. Jimenez-Mallebrera was responsible for conceptualization and supervision; S. Trifunov conducted investigation and was responsible for formal analysis and visualization; A.J. Paredes-Fuentes conducted investigation, validation, visualization and data curation; C. Badosa, A. Codina, J. Montoya, E. Ruiz-Pesini, C. Jou, G. Garrabou, J.M. Grau-Junyent, D. Yubero, R. Montero, J.D. Ortigoza-Escobar, M.M. O'Callaghan, A. Nascimento, A. Català, and A. Garcia-Cazorla were responsible for methodology and investigation; J. Muchart was responsible for acquisition of neuroimaging data; all co-authors participated in critically reviewing the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the author disclosure form. Disclosures and/or potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: None declared.

Consultant or Advisory Role: None declared.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: None declared.

Research Funding: A.J. Paredes-Fuentes, Instituto de Salud Carlos III (FI18/00253); R. Artuch, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-FIS PI17/00109 and PI20/00340), the FEDER Funding Program from the European Union and CIBERER-ISCIII to institution; G. Garrabou, CIBERER (ACCI ER20P2AC722).

Expert Testimony: None declared.

Patents: None declared.

Role of Sponsor: The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, preparation of manuscript, or final approval of manuscript.

Acknowledgments: We thank the patients and their families for their collaboration in this study. We are grateful to the Biobanc de l'Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació, which is integrated in the Spanish Biobank Network of ISCIII.

References

- Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders; past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2004;1659:115–20.
- Wallace DC. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 2001;106:94–101.
- Montero R, Yubero D, Villarroya J, Henares D, Jou C, Rodríguez MA, et al. GDF-15 is elevated in children with mitochondrial diseases and is induced by mitochondrial dysfunction. *PLoS One* 2016;11:e0148709.
- Kremer LS, Wortmann SB, Prokisch H. "Transcriptomics": molecular diagnosis of inborn errors of metabolism via RNA-sequencing. *J Inher Metab Dis* 2018;41:525–32.
- Parikh S, Karaa A, Goldstein A, Bertini ES, Chinnery PF, Christodoulou J, et al. Diagnosis of "possible" mitochondrial disease: an existential crisis. *J Med Genet* 2019;56:123–30.
- Pitceathly RDS, Rahman S, Hanna MG. Single deletions in mitochondrial DNA: molecular mechanisms and disease phenotypes in clinical practice. *Neuromuscul Disord* 2012;22:577–86.
- Viscomi C, Zeviani M. mtDNA-maintenance defects: syndromes and genes. *J Inher Metab Dis* 2017;40:587–99.
- Lowes H, Pyle A, Santibanez-Koref M, Hudson G. Circulating cell-free mitochondrial DNA levels in Parkinson's disease are influenced by treatment. *Mol Neurodegener* 2020;15:10.

ccf-mtDNA in CSF as Biomarker for MD

9. Rahat B, Ali T, Sapehia D, Mahajan A, Kaur J. Circulating cell-free nucleic acids as epigenetic biomarkers in precision medicine. *Front Genet* 2020;11:844.
10. Maresca A, Del Dotto V, Romagnoli M, La Morgia C, Di Vito L, Capristo M, et al. the ER-MITO Study Group. Expanding and validating the biomarkers for mitochondrial diseases. *J Mol Med* 2020;98:1467-78.
11. Gambardella S, Limanaqi F, Ferese R, Biagioni F, Campopiano R, Centonze D, Fornai F. ccf-mtDNA as a potential link between the brain and immune system in neuro-immunological disorders. *Front Immunol* 2019;10:1064.
12. Thuraiajah K, Briggs GD, Balogh ZJ. The source of cell-free mitochondrial DNA in trauma and potential therapeutic strategies. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2018;44:325-34.
13. Lu B, Kwan K, Levine YA, Olofsson PS, Yang H, Li J, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor signaling inhibits inflammasome activation by preventing mitochondrial DNA release. *Mol Med* 2014;20:350-8.
14. Pan J, Ou Z, Cai C, Li P, Gong J, Ruan XZ, et al. Fatty acid activates NLRP3 inflammasomes in mouse Kupffer cells through mitochondrial DNA release. *Cell Immunol* 2018;332:111-20.
15. Podlesniy P, Figueiro-Silva J, Llado A, Antonell A, Sanchez-Valle R, Alcolea D, et al. Low cerebrospinal fluid concentration of mitochondrial DNA in preclinical Alzheimer disease. *Ann Neurol* 2013;74:655-68.
16. Pyle A, Brennan R, Kurzawa-Akanbi M, Yarnall A, Thouin A, Mollenhauer B, et al. Reduced cerebrospinal fluid mitochondrial DNA is a biomarker for early-stage Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2015;78:1000-4.
17. Battlori M, Casado M, Sierra C, Salgado M del C, Marti-Sanchez L, Maynou J, et al. Effect of blood contamination of cerebrospinal fluid on amino acids, biogenic amines, pterins and vitamins. *Fluids Barriers CNS* 2019;16:34.
18. Podlesniy P, Trullas R. Biomarkers in cerebrospinal fluid: analysis of cell-free circulating mitochondrial DNA by digital PCR. In: *Methods in molecular biology*. Vol 1768. Humana Press Inc, New York, NY; 2018. pp. 111-26.
19. Trifunov S, Pyle A, Valentino ML, Liguori R, Yu-Wai-Man P, Burté F, et al. Clonal expansion of mtDNA deletions: different disease models assessed by digital droplet PCR in single muscle cells. *Sci Rep* 2018;8:1-10.
20. Krishnan KJ, Bender A, Taylor RW, Turnbull DM. A multiplex real-time PCR method to detect and quantify mitochondrial DNA deletions in individual cells. *Anal Biochem* 2007;370:127-9.
21. He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, et al. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e68-e68.
22. Damas J, Samuels DC, Carneiro J, Amorim A, Pereira F. Mitochondrial DNA rearrangements in health and disease: a comprehensive study. *Hum Mutat* 2014;35:1-14.
23. Casado M, Sierra C, Battlori M, Artuch R, Ormazabal A. A targeted metabolomic procedure for amino acid analysis in different biological specimens by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Metabolomics* 2018;14:1-12.
24. Chen A, Li J, Wang L, Huang Q, Zhu J, Wen S, et al. Comparison of paired cerebrospinal fluid and serum cell-free mitochondrial and nuclear DNA with copy number and fragment length. *J Clin Lab Anal* 2020;34:34.
25. Carelli V, Maresca A, Caporali L, Trifunov S, Zanna C, Rugolo M. Mitochondria: biogenesis and mitophagy balance in segregation and clonal expansion of mitochondrial DNA mutations. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;63:21-425.
26. Boczonadi V, Horvath R. Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;48:77-84.
27. Tanji K, Schon EA, Dimauro S, Bonilla E. Kearns-Sayre syndrome: oncogenic transformation of choroid plexus epithelium. *J Neurol Sci* 2000;178:29-36.
28. Thayer RE, Wittock R, Parr R, Zullo S, Birch-Machin MA. A maternal line study investigating the 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *Exp Gerontol* 2003;38:567-71.
29. Zhang Y, Ma Y, Bu D, Liu H, Xia C, Zhang Y, et al. Deletion of a 4977-bp fragment in the mitochondrial genome is associated with mitochondrial disease severity. *PLoS One* 2015;10:e0128624.
30. Kauppila TES, Kauppila JHK, Larsson NG. Mammalian mitochondria and aging: an update. *Cell Metab* 2017;25:57-71.
31. Lowes H, Pyle A, Duddy M, Hudson G. Cell-free mitochondrial DNA in progressive multiple sclerosis. *Mitochondrion* 2019;46:307-12.
32. García-Cazorla A, Quadros EV, Nascimento A, García-Silva MT, Briones P, Montoya J, et al. Mitochondrial diseases associated with cerebral folate deficiency. *Neurology* 2008;70:1360-2.

Control	Age (years)	Sex	ccfmitDNA (copies/ μ L)	GDF-15 (pg/mL)	mtDNA deletions (%)
1	3	M	7.37	152.92	9.27
2	0.75	F	1.35	n.a.	0.00
3	1	M	n.a.	n.a.	n.a.
4	0.04	M	20.90	229.61	7.92
5	0.02	M	n.a.	n.a.	n.a.
6	0.07	M	10.17	n.a.	n.a.
7	6	M	24.17	44.86	5.13
8	21	M	31.30	142.08	2.49
9	34	M	10.85	n.a.	0.00
10	16	M	6.30	66.25	8.33
11	0.06	F	5.35	417.45	0.00
12	0.08	M	10.15	200.35	19.03
13	0.67	M	7.90	62.37	12.96
14	0.5	M	1.35	100.88	0.00
15	0.02	M	19.55	275.99	6.26
16	0.58	F	12.65	158.25	4.20
17	0.08	M	7.55	333.02	12.74
18	1	F	2.90	33.03	18.54
19	0.07	M	29.25	100.18	0.00
20	6	F	1.00	60.46	0.00

Supplemental Table 1. Age, sex, mean ccfmitDNA copy numbers, GDF-15 concentrations and mtDNA deletions (%) for controls. Abbreviations: F, female; M, male; n.a., not available.

Primer or probe	Sequence (5'-3')	Amplicon length (bp)
ND1 forward	CCCTAAACCCGCCACATCT	69
ND1 reverse	GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT	
ND1 probe	6-FAM/CCATCACCC/Zen/TCTACATCACCGCCC/IABkFQ	
ND4 forward	CCATTCTCCTCCTATCCCTCAAC	84
ND4 reverse	CACAATCTGATGTTTGGTTAAACTATAATT	
ND4 probe	HEX/CCGACATCA/Zen/TTACCGGGTTTCTCTCTTG/IABkFQ	
B2M forward	CACTGAAAAAGATGAGTATGCC	231
B2M reverse	AACATTCCTGACAAATCCC	
B2M probe	HEX/CCGTGTGAA/Zen/CCATGTGACTTTGTC/IABkFQ	
BAX forward	CCAGGATCGAGCAGGGCGAA	93
BAX reverse	CACTCGCTCAGCTTCTTGGT	
BAX probe	HEX/CCCGAGCTG/Zen/GCCCTGGACCCGGT/IABkFQ/	

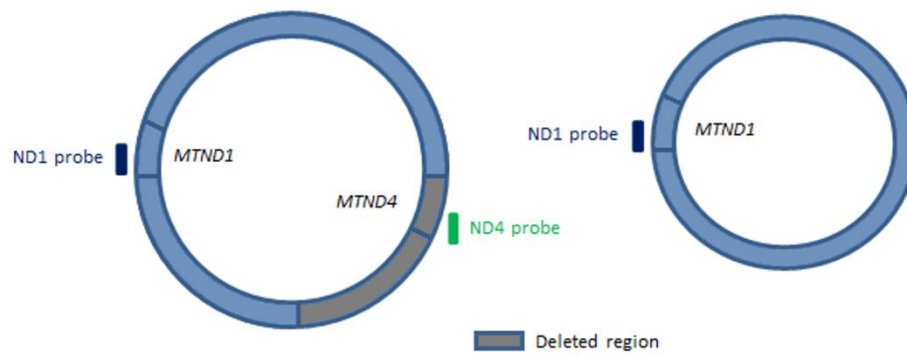
Supplemental Table 2. List of primers and probes used for ddPCR. Abbreviations: 6-FAM, 6-carboxyfluorescein; Zen, internal ZEN® quencher; IABkFQ, Iowa Black® FQ quencher; HEX, hexachlorofluorescein.

Patient	ccfmdDNA (copies/ μ L)	B2M (copies/ μ L)	B4X (copies/ μ L)	Control	ccfmdDNA (copies/ μ L)	B2M (copies/ μ L)	B4X (copies/ μ L)
1	25.1	0	n.a.	1	7.37	0.22	0.08
2	26.9	0.08	0.40	2	1.35	0.19	0.07
3	9.70	0.11	0	3	n.a.	n.a.	n.a.
4	3.17	0.05	0.17	4	20.90	0.16	0.11
5	12.8	0.18	0.23	5	n.a.	n.a.	n.a.
6	91.2	0.14	0.16	6	10.17	0.03	0.02
7	319	0.25	0.03	7	24.17	0.15	0.51
8	18.1	0.23	0.18	8	31.30	0.11	0.56
9	23.2	0.23	0.39	9	10.85	0.08	0.10
10	8.03	0.10	0.15	10	6.30	0	0.06
11	32.4	0.12	0.58	11	5.35	0.05	0.03
12	16.2	0.15	n.a.	12	10.15	0.04	0
13	32.2	0.07	0.22	13	7.90	0.08	0
14	113	0.05	n.a.	14	1.35	0	0
15	138	0.06	0.11	15	19.55	0.08	0.18
16	30.2	0.04	0.11	16	12.65	0.04	0
17	37.7	0.05	0.32	17	7.55	0.04	0
18	55.5	0.14	n.a.	18	2.90	0.04	0.06
19	37.3	0.03	0.21	19	29.25	0.05	0.16
20	70.4	0	0.25	20	1.00	0.05	0.04
21	13.8	0.05	0.55				
22	228	0.06	n.a.				
23	22.5	0	n.a.				
24	94.8	0.08	0.76				
25	66.8	0.03	n.a.				

Supplemental Table 3. ccfmdDNA, B2M and B4X copy numbers for MD patients and controls. Abbreviations: n.a., not available

Patient	mtDNA deletions (%)	Alanine (μmol/L)	Lactate (mmol/L)	Total protein (mg/dL)
1	12.04	26	2.07	66
2	4.07	21	1.47	34
3	72.11	n.a.	2.61	22
4	13.33	56	3.86	34
5	20.63	54	2.26	17
6	55.60	48.5	6.41	157
7	30.95	n.a.	n.a.	n.a.
8	5.94	n.a.	n.a.	n.a.
9	14.74	54.4	4.57	80
10	5.02	24.7	n.a.	14
11	57.77	41.7	2.97	17
12	0.57	50	2.99	24
13	1.34	22	1.78	17
14	13.38	42	5.16	89
15	33.73	54	3.22	n.a.
16	5.42	63	3.41	38
17	0.00	50	5.98	80
18	0.00	25	3.32	113
19	23.91	31	2.73	168
20	10.43	37	3.46	244
21	4.59	19	2	34
22	7.24	n.a.	n.a.	10
23	0.00	46	3.17	26
24	5.76	44	2.92	n.a.
25	1.65	21	1.69	30

Supplemental Table 4. Mean mtDNA deletions (%), alanine, lactate and total protein values for MD patients. We considered that values greater than 10% of deletions were positive for their presence. Abbreviations: n.a., not available



Supplemental Fig. 1. Schematic representation of a normal (left) and deleted (right) mtDNA. The deleted mtDNA is smaller than the normal mtDNA by missing a section of the genome (light gray section). The sites of the probes used for the ddPCR are shown (dark blue and green boxes). The *MTND4* gene is frequently deleted, whilst *MTND1* remains even in the deleted molecule.

Capítulo 2: Analizar la concentración de CoQ en diferentes muestras biológicas con fines diagnósticos y de monitorización del tratamiento: determinación de CoQ en plasma, músculo, fibroblastos, orina, plaquetas y células mononucleares.

Publicación 2

Título: *Coenzyme Q₁₀ treatment monitoring in different human biological samples*

Autores: Abraham J. Paredes-Fuentes ¹, Raquel Montero ¹, Anna Codina ², Cristina Jou ^{2,3}, Guerau Fernández ⁴, Joan Maynou ⁴, Carlos Santos-Ocaña ^{3,5}, Joan Riera ⁶, Plácido Navas ^{3,5}, Franchek Drobnic ⁶ and Rafael Artuch ^{1,3}

¹ Clinical Biochemistry Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain; ² Pathology Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain; ³ CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Calle Monforte de Lemos, 3-5, 28029 Madrid, Spain; ⁴ Molecular Genetics Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁵ Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-CSIC-JA, Carretera de Utrera km 1, 41013 Sevilla, Spain; ⁶ Sport Nutrition and Physiology Department, Olympic Training Center, CAR-GIRSANE, Avinguda de l'Alcalde Barnils, 3, 08173 Sant Cugat del Vallés, Barcelona, Spain.

Referencia: Antioxidants (Basel). 2020 Oct 13;9(10):979. doi: 10.3390/antiox9100979



Communication

Coenzyme Q₁₀ Treatment Monitoring in Different Human Biological Samples

Abraham J. Paredes-Fuentes ¹, Raquel Montero ¹, Anna Codina ², Cristina Jou ^{2,3}, Guerau Fernández ⁴, Joan Maynou ⁴, Carlos Santos-Ocaña ^{3,5}, Joan Riera ⁶, Plácido Navas ^{3,5}, Franchek Drobnic ⁶ and Rafael Artuch ^{1,3,*}

- ¹ Clinical Biochemistry Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain; ajparedes@fsjd.org (A.J.P.-F.); rmontero@sjdhospitalbarcelona.org (R.M.)
 - ² Pathology Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain; acodina@fsjd.org (A.C.); cjou@sjdhospitalbarcelona.org (C.J.)
 - ³ CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Calle Monforte de Lemos, 3-5, 28029 Madrid, Spain; csanoca@upo.es (C.S.-O.); pnavas@upo.es (P.N.)
 - ⁴ Molecular Genetics Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain; gfernandez@sjdhospitalbarcelona.org (G.F.); jmaynou@sjdhospitalbarcelona.org (J.M.)
 - ⁵ Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide-CSIC-JA, Carretera de Utrera km 1, 41013 Sevilla, Spain
 - ⁶ Sport Nutrition and Physiology Department, Olympic Training Center, CAR-GIRSANE, Avinguda de l'Alcalde Barnils, 3, 08173 Sant Cugat del Vallés, Barcelona, Spain; jriera@car.edu (J.R.); docdrobnic@gmail.com (F.D.)
- * Correspondence: rartuch@sjdhospitalbarcelona.org

Received: 2 September 2020; Accepted: 10 October 2020; Published: 13 October 2020



Abstract: Coenzyme Q₁₀ (CoQ) treatment monitoring is a matter of debate since CoQ distribution from plasma to blood cells and tissues is not fully understood. We aimed to analyze the CoQ levels in a wide set of human biological samples (plasma, blood mononuclear cells (BMCs), platelets, urinary cells, and skeletal muscle) from a group of 11 healthy male runners before and after CoQ supplementation. The CoQ content in the different samples was analyzed by HPLC coupled to electrochemical detection. No significant differences were observed in the CoQ levels measured in the BMCs, platelets, and urine after the one-month treatment period. Plasma CoQ (expressed in absolute values and values relative to total cholesterol) significantly increased after CoQ supplementation ($p = 0.003$ in both cases), and the increase in CoQ in muscle approached significance ($p = 0.074$). CoQ levels were increased in the plasma of all supplemented subjects, and muscle CoQ levels were increased in 8 out of 10 supplemented subjects. In conclusion, the analysis of CoQ in plasma samples seems to be the best surrogate biomarker for CoQ treatment monitoring. Moreover, oral CoQ administration was effective for increasing muscle CoQ concentrations in most subjects.

Keywords: coenzyme Q₁₀; antioxidants; supplementation; treatment monitoring; skeletal muscle; urine; platelets; blood mononuclear cells; plasma

1. Introduction

Coenzyme Q₁₀ (CoQ) is a lipid present in cell membranes, and it is ubiquitously synthesized in organs. CoQ is transported in the blood (serum) by cholesterol lipoproteins, and approximately 20% of total blood CoQ comes from dietary sources [1]. CoQ is composed of a benzoquinone ring and a polyisoprenoid side chain comprising ten units in humans. CoQ is involved in several biological

functions, such as electron transport in the mitochondrial respiratory chain and ATP production inside the mitochondria. CoQ also plays key antioxidant functions in cell membranes and circulating cholesterol, protecting them from harmful oxidative damage [2].

CoQ deficiency may be associated with diverse inherited or acquired pathological conditions, and it may be defined by the decrease in CoQ content in biological specimens (being blood, muscle, and cultured skin fibroblasts the most common samples analyzed) [3]. Genetic primary CoQ deficiencies are inherited metabolic disorders due to mutations in the genes encoding proteins of the CoQ biosynthetic pathway (COQ genes), which impair mitochondrial oxidative phosphorylation and cause clinically heterogeneous phenotypes [4]. Secondary CoQ deficiencies have been associated with a wide variety of conditions, such as mitochondrial and non-mitochondrial metabolic disorders, neurodegenerative diseases, aging-related oxidative stress, diabetes, cancer, cardiovascular diseases, and statin treatment. Thus, the diagnosis of CoQ deficiency seems important since early treatment initiation with oral CoQ may change the natural history of patients with these diseases. Patients with some forms of CoQ deficiency have shown clinical improvement with oral CoQ supplementation [5].

At present, CoQ treatment monitoring is a matter of debate. CoQ distribution from the serum to cells and tissues after oral intake is not fully understood, and the best biological sample to monitor patients under CoQ supplementation is currently under discussion [6]. Furthermore, different CoQ formulations are available with potentially different bio availabilities, depending on whether the CoQ is in the oxidized or the reduced form and what excipients are used [7]. There is also no agreement regarding the recommended supplementation dose. Some studies have reported changes in CoQ concentrations, mainly in muscle, plasma, blood mononuclear cells (BMCs), and platelets, after treatment [8–15]. CoQ may also be analyzed in other samples, such as urine, cerebrospinal fluid (CSF), and fibroblasts [6].

With this background, we aimed to analyze the CoQ levels in a set of human biological samples (plasma, BMCs, platelets, urinary cells, and skeletal muscle) in a group of healthy male runners before and after CoQ supplementation. We assessed the following: (a) which sample was the most appropriate for CoQ treatment monitoring, and (b) whether CoQ levels in the muscle increased after CoQ supplementation, as this is one of the target organs of CoQ therapeutic treatment.

2. Materials and Methods

2.1. Participants

A group of 11 healthy male runners was recruited for the study. They agreed to avoid the use of vitamin/mineral supplements during the duration of the study. During this period, all subjects maintained their physical activity with no changes in their diet or lifestyle. The mean and standard deviation (SD) of the age, weight, and body mass index of the subjects were 54.6 ± 4.3 years old, 76.8 ± 8.3 kg, and 25.1 ± 2.7 kg/m², respectively. These subjects were studied at baseline (group 1, PRE) and after one month of CoQ supplementation (group 2, POST). It was not possible to perform a muscle biopsy in one of the subjects after CoQ supplementation due to a muscular injury that was not related to the study.

2.2. CoQ Treatment Protocol

Subjects took a CoQ phytosome capsule (UBIQSOME®, Indena SpA, Milan, Italy) (oral administration), equivalent to 100 mg of ubiquinone (the oxidized form of CoQ), once a day for four weeks. CoQ administration was carried out together with a meal at noon.

2.3. Samples

All samples were collected during the fasting state at baseline and after the one-month follow-up period.

- Blood samples: Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) blood samples were drawn to separate BMCs, platelets, and plasma. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation ($60\times g$, 15 min, room temperature), as previously reported [16]. The PRP was then centrifuged ($965\times g$, 20 min, room temperature) to pellet the platelets. The platelet count was analyzed in an ADVIA 2120 hematology analyzer (Siemens Healthineers, Erlangen, Germany). For BMCs isolation, the Histopaque 1077 procedure was used, as previously reported [17]. The plasma samples were separated by centrifugation ($1500\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). All the blood-derived samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until CoQ analysis.
- Urine samples: The first morning urine samples were collected in standard urine containers. After centrifugation ($1500\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), the urinary pellet was washed with 9 mg/mL saline solution and then centrifuged as before to remove urinary proteins. The urinary pellet was stored frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until CoQ analysis. The details of this procedure are reported elsewhere [18].
- Muscle samples: skeletal muscle samples were collected from the *vastus lateralis* muscle by vacuum-assisted biopsy. The muscle was weighed and homogenized with cold SETH buffer in an ice bath. The mixture was then vortexed, sonicated, and transferred to a polypropylene tube, followed by vortexing for 2 min, sonication for 5 min, and centrifugation ($1500\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). The supernatant was frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until CoQ analysis.

2.4. CoQ Determination

The CoQ content in the different biological samples was analyzed by HPLC (Waters, Milford, MA, USA) coupled to electrochemical detection (Coulchem II, ESA, Chelmsford, MA, USA), as previously reported [19]. Calibrators, controls, and biological samples were prepared in the same way. Internal standard (coenzyme Q₉ [CoQ₉] in ethanol) was added to all samples. After deproteinization, hexane was added to extract both CoQ₉ and CoQ for 10 min by vortexing. After centrifugation at $1.500\times g$ (10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), the hexane phase was collected, filtered using a $0.22\text{ }\mu\text{m}$ filter, evaporated to dryness under a nitrogen stream, and re-dissolved in methanol/ethanol (60:40, *v/v*). The mobile phase consisted of 1.06 g/L lithium perchlorate in methanol/ethanol (60:40, *v/v*), and CoQ was separated in Nucleosil C-18 columns (Teknokroma, Sant Cugat del Vallés, Spain). For plasma, platelets, and urine CoQ separation, a column of $250\times 4.6\text{ mm}$ (length and internal diameter, respectively; particle size $5\text{ }\mu\text{m}$) was used, since some naturally occurring interferences may elute close to CoQ₉. For muscle and BMCs, a 150 mm length column was used, shortening the retention times. Typical chromatograms from the different specimens are shown in Figure 1. Once the CoQ was separated, it was quantified by electrochemical detection (the analytical cell was set to -600 mV and $+600\text{ mV}$; model 5010) using CoQ₉ as the internal standard. The flow rate was 1 mL/min, and the injection volume was $50\text{ }\mu\text{L}$ ($100\text{ }\mu\text{L}$ for urine samples). Since CoQ is related to cholesterol [20], total plasma cholesterol (Chol) values were analyzed by the automated cholesterol oxidase procedure in an Architect autoanalyzer (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA). To estimate the cell content of the BMCs, urine, and muscle samples, the total protein concentration was determined by the Lowry method [21]. The CoQ values were normalized to the total protein concentration in the abovementioned specimens. In platelets, CoQ values were normalized to platelet count.

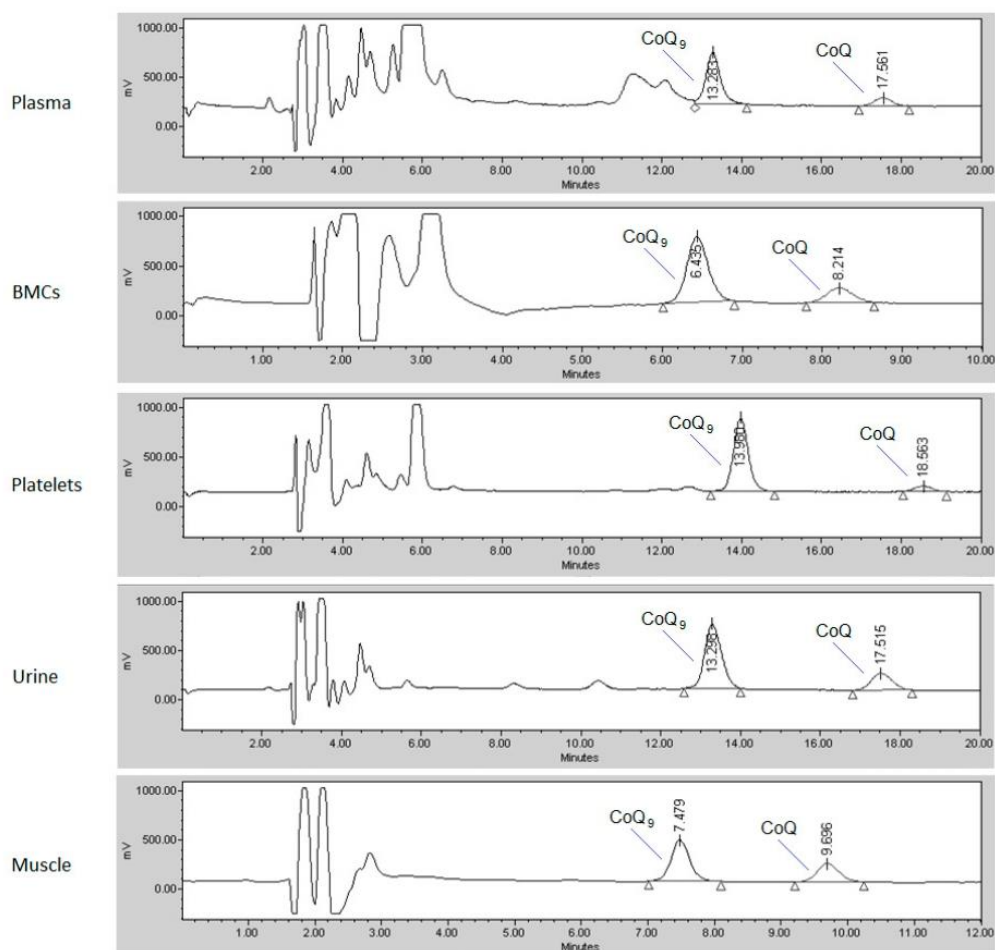


Figure 1. Typical chromatograms of coenzyme Q₁₀ (CoQ) determination (HPLC with electrochemical detection) in the different biological samples: plasma, platelets, blood mononuclear cells (BMCs), urine, and muscle. Coenzyme Q₉ (CoQ₉) was used as the internal standard.

2.5. Ethical Issues

All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and it was approved by the local Ethics Committee of the *Direcció General de l'Esport de la Generalitat de Catalunya* with the number 07/2018/CEICGC. The study was also registered at [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) with the identifier NCT03893864.

2.6. Statistical Analysis

The Wilcoxon test was applied to compare paired data between the baseline and one-month follow-up period in all the different variables. The Spearman correlation test was used to correlate plasma and muscle CoQ values. Statistical calculations were performed using IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3. Results

The biochemical results of healthy male runners recruited for CoQ supplementation are shown in Table 1. The data are expressed as the range, mean, and SD, together with previously reported reference values in the literature.

Table 1. Biochemical results of subjects before (group 1, PRE) and after (group 2, POST) coenzyme Q₁₀ (CoQ) supplementation. Data are expressed as range, average, and standard deviation, together with previously reported reference values in the literature.

	Plasma CoQ (μmol/L)	Plasma CoQ/Chol (μmol/mol Chol and Chol (mmol/L)	BMCs CoQ (nmol/g Protein)	Platelets CoQ (pmol/10 ⁹ Platelets)	Urinary CoQ (nmol/g Protein)	Muscle CoQ (nmol/g Protein)
Group 1, PRE (n = 11)	0.76–1.53 1.11 (0.23)	169–317 212 (43.2) and 3.82–6.53 5.32 (0.82)	32–124 75 (32.4)	154–598 288 (135.5)	28–362 132 (98.2)	127–380 245 (90.7)
Group 2, POST (n = 11)	1.33–3.17 2.34 (0.55)	302–753 476 (145) and 4.18–6.13 5.02 (0.62)	40–166 96 (42.9)	205–517 304 (97.6)	69–738 230 (185)	162–434 299 (98.6) *
Reference values **	0.46–1.78 Ref. [22]	101–265 Ref. [22]	37–133 Ref. [23]	133–247 Ref. [15]	43–139 Ref. [18]	140–580 Ref. [23]

* The muscle biopsy of one subject could not be collected after CoQ supplementation. ** Reference values reported in the literature by other groups. A good agreement was observed with data from subjects at baseline (group 1) and also with our own reference values [18,20,24]. Abbreviations: BMCs, blood mononuclear cells; Chol, total plasma cholesterol; CoQ, coenzyme Q₁₀.

When we compared the subjects recruited for CoQ supplementation at baseline (group 1, PRE) and previously reported reference values, a good agreement was observed for CoQ values in plasma, BMCs, platelets, urine, and muscle samples. The muscle CoQ values in group 1 were similar to the reference ranges previously reported by our group and others [23,24].

The Wilcoxon test was used to compare the CoQ status in the different samples before and after CoQ supplementation. No significant differences were observed in the CoQ levels measured in the BMCs, platelets, and urine (Figure 2). The plasma CoQ levels expressed in absolute values and relative to total cholesterol significantly increased after CoQ supplementation ($p = 0.003$ in both cases), and the increase in CoQ in skeletal muscle after CoQ supplementation approached significance ($p = 0.074$) (Table 1, Figures 2 and 3). No correlation was observed between plasma and muscle CoQ values. After the supplementation period, the plasma CoQ concentration was increased in all the treated subjects, and the muscle CoQ levels were increased in 8 out of the 10 treated subjects (Figures 2 and 3). Since the subjects' weights ranged from 62.5 to 87.5 kg and all of them received the same amount of CoQ, the doses ranged from 1.14 to 1.60 mg/kg body weight (mean 1.33, SD 0.15). The two subjects who did not show increased muscle CoQ values weighed 83.8 and 84.2 kg (the second and the third in order of weight).

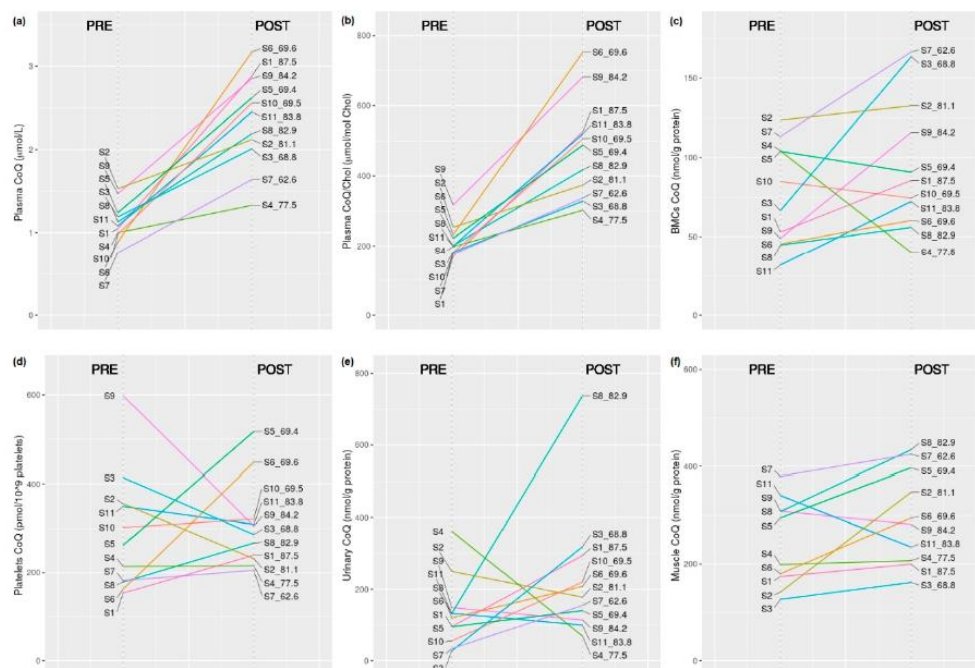


Figure 2. Graphic representation of the individual CoQ values obtained in the different biological specimens before (group 1, PRE) and after (group 2, POST) CoQ supplementation in the 11 participants: (a) plasma, (b) plasma CoQ/Chol ratio, (c) BMCs, (d) platelets, (e) urine, and (f) skeletal muscle. The body weight (kg) of each subject is indicated on the right side (POST).

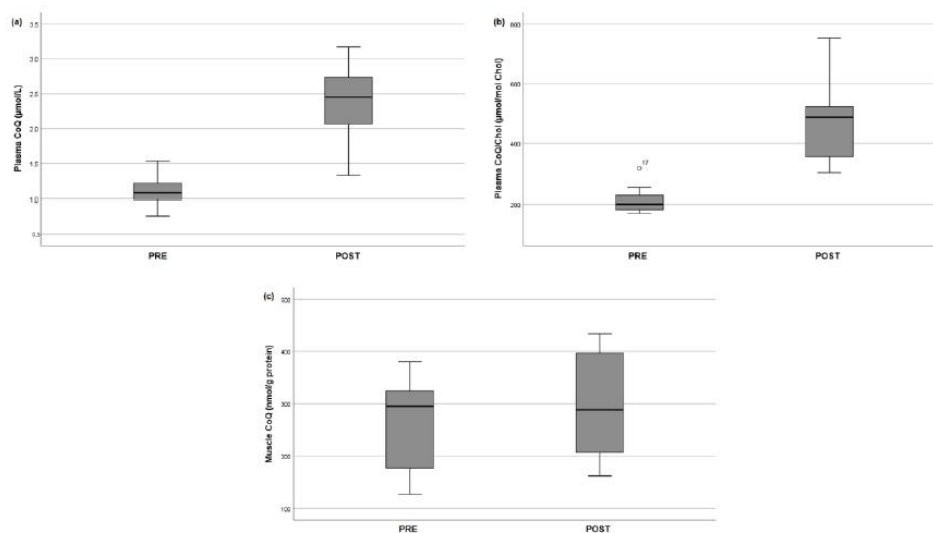


Figure 3. Box-plot representation of plasma CoQ values expressed as absolute values (a) and values relative to total cholesterol (b), and of muscle CoQ concentrations (c) before (PRE) and after (POST) CoQ supplementation. The length of the boxes indicates the interquartile space (p25–p75), the horizontal line into the box represents the median (p50), and the circle indicates an outlier value.

4. Discussion

CoQ treatment seems important, considering the key role of CoQ in vital biological processes. In this work, we analyzed several samples to assess which one is the most suitable to monitor during CoQ treatment and also to determine if CoQ supplementation increases CoQ levels in skeletal muscle. To the best of our knowledge, no studies have assessed CoQ status after supplementation in the wide array of biological samples studied here. The dosage employed is widely used in different food supplements [25].

Regarding the quantitative CoQ values in the different samples (Table 1), the concentration observed at baseline for group 1 was in agreement with our previous reference values and those reported by other authors [15,18,20,22–24].

When we compared the subjects before and after CoQ supplementation, no differences were observed in the BMCs, platelets, and urine CoQ values. The BMCs CoQ data are controversial: While Arias et al. found that lymphocyte CoQ concentrations were not significantly increased after CoQ supplementation at 100 mg/day for one week [11], other authors did find increased levels of CoQ in lymphocytes after CoQ supplementation over the same period and doses [13]; at higher doses (200 mg/day), increased CoQ in BMCs was demonstrated [12]. Regarding platelets, similar controversial results have been reported. We observed a slight but not significant increase in the mean platelet CoQ values after the supplementation period, although 4 out of 11 supplemented runners did not show any increase in CoQ. Niklowitz et al. reported that CoQ supplementation significantly increased the platelet CoQ levels after 14 days of supplementation (3 mg/kg body weight/day), with a further increase observed after 28 days, although this was not statistically significant [15]. Miles and coworkers reported similar results in the platelet total CoQ concentration after supplementation (5 mg/kg body weight, 28 days) [14]. In any case, in the abovementioned studies, the oral CoQ doses relative to body weight were moderately higher than those reported here. No previous studies have reported the use of urine CoQ levels for treatment monitoring purposes [18]. The involvement of the kidney in mitochondrial diseases and CoQ deficiencies strongly suggests that this non-invasive sample would be useful for treatment monitoring purposes as a surrogate biomarker of kidney CoQ status, considering that CoQ treatment regimens for mitochondrial disease patients (which can reach up to 30 mg/kg body weight/day) are remarkably higher than the doses employed in our study. In summary, these samples (BMCs, platelets, and urine) do not seem adequate for CoQ treatment monitoring, at least at these CoQ doses. A plausible explanation for this is that the CoQ status in BMCs, platelets, or urine probably displays a high biological variation. Moreover, the extensive preanalytical preparation required for cell isolation may also explain such variations, especially when compared with the direct measurement of plasma CoQ content.

Plasma was the best sample for monitoring, either analyzing total CoQ values or values relative to Chol, a molecule closely related to CoQ biosynthesis [20]. All 11 participants increased their plasma CoQ values after CoQ supplementation. This observation has been reported by several authors [8,12,15]. The main concern regarding plasma is that it only reflects the intestinal absorption and liver metabolism of supplemented CoQ but not the uptake of CoQ by tissues, which is, in fact, largely unknown in humans [26]. For this reason, we decided to measure muscle CoQ along with plasma CoQ.

Skeletal muscle is a tissue with high energy demands that is rich in mitochondria and CoQ. Most mitochondrial diseases have muscle as a target organ. Thus, knowing whether or not CoQ reaches the muscle is of paramount importance for the treatment of patients with mitochondrial diseases, inherited metabolic disorders, and neurogenetic diseases leading to CoQ deficiency. Although we did not observe significant differences in muscle before and after CoQ supplementation neither a correlation between plasma and muscle CoQ values, the truth is that 8 out of 10 supplemented subjects showed increases in their muscle CoQ values. Furthermore, the only two subjects whose muscle CoQ values did not increase after supplementation had two of the lowest CoQ doses in terms of their body weight (Figure 3). Plausible explanations for the lack of correlation between muscle and plasma CoQ would be the limited size of our series and that the biological factors modulating plasma and muscle

CoQ status are different. Previous studies showed that oral supplementation (150 mg/day, 4 weeks) did not significantly alter the CoQ levels in skeletal muscle despite a significant elevation in the plasma CoQ concentration [9]. As observed here, Cooke and coworkers found that acute CoQ supplementation (200 mg/day) tended to increase the CoQ levels in muscle, although they did not observe significant changes following a 14-day supplementation period [8]. Considering that the CoQ doses relative to subject weights in previous reports were similar to those in our work, the differences observed could be explained by the differences in the CoQ formulations and excipients. In fact, considerable differences in the bioavailability of different CoQ formulations monitored in human plasma samples in an elderly population have recently been reported [25]. The formulation employed in this study (a phytosome capsule) is a mixture of phospholipids (lecithin) and CoQ, being CoQ placed among phospholipid molecules, which has been demonstrated to be safe and increase CoQ absorption in humans [27]. In any case, our findings strongly suggest that at higher CoQ doses, it is likely that all subjects would display an increase in the CoQ values in muscle.

5. Conclusions

In conclusion, the quantification of plasma CoQ values seems to be the best surrogate biomarker for oral CoQ treatment monitoring, since plasma CoQ increased in all cases in contrast to the variable responses observed in the other biological specimens. Under the conditions of our study, our results could potentially suggest that oral CoQ supplementation with this formulation was effective for increasing muscle CoQ concentrations in most subjects.

Author Contributions: R.A. and F.D. were responsible for conceptualization, supervision, funding acquisition, and writing the original draft of the manuscript; R.M., A.C., C.J., and J.R. were responsible for methodology and investigation; A.J.P.-F. conducted investigation, validation, and data curation; G.F. and J.M. were responsible for formal analysis and visualization; C.S.-O. and P.N. were responsible for funding acquisition, conceptualization and validation; all co-authors participated in finalizing the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-FIS PI17/00109 and PI17/01286), the FEDER Funding Program from the European Union and CIBERER-ISCIII. A.J.P.-F. holds a grant from the Instituto de Salud Carlos III (FI18/00253).

Conflicts of Interest: This work was partially funded by Indena SpA (Italy), contributing to the provision of CoQ phytosome capsules and the purchase of some of the consumables used for CoQ determination. The funders had no role in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish these results.

References

1. Weber, C.; Bysted, A.; Hølmer, G. Coenzyme Q10 in the diet-daily intake and relative bioavailability. *Mol. Asp. Med.* **1997**, *18*, S251–S254. [\[CrossRef\]](#)
2. Turunen, M.; Olsson, J.; Dallner, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1660*, 171–199. [\[CrossRef\]](#)
3. Rodríguez-Aguilera, J.; Cortés, A.; Fernández-Ayala, D.; Navas, P. Biochemical assessment of coenzyme Q10 deficiency. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 27. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Alcázar-Fabra, M.; Trevisson, E.; Brea-Calvo, G. Clinical syndromes associated with coenzyme Q10 deficiency. *Essays Biochem.* **2018**, *62*, 377–398. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Desbats, M.A.; Lunardi, G.; Doimo, M.; Trevisson, E.; Salviati, L. Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ10) deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* **2014**, *38*, 145–156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Yubero, D.; Allen, G.; Artuch, R.; Montero, R. The value of coenzyme Q10 determination in mitochondrial patients. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 37. [\[CrossRef\]](#)
7. López-Lluch, G.; del Pozo-Cruz, J.; Sánchez-Cuesta, A.; Cortés-Rodríguez, A.B.; Navas, P. Bioavailability of coenzyme Q10 supplements depends on carrier lipids and solubilization. *Nutrition* **2019**, *57*, 133–140. [\[CrossRef\]](#)

8. Cooke, M.; Iosia, M.; Buford, T.; Shelmadine, B.; Hudson, G.; Kerksick, C.; Rasmussen, C.; Greenwood, M.; Leutholtz, B.; Willoughby, D.; et al. Effects of acute and 14-day coenzyme Q10 supplementation on exercise performance in both trained and untrained individuals. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2008**, *5*. [[CrossRef](#)]
9. Zhou, S.; Zhang, Y.; Davie, A.; Marshall-Gradisnik, S.; Hu, H.; Wang, J.; Brushett, D. Muscle and plasma coenzyme Q10 concentration, aerobic power and exercise economy of healthy men in response to four weeks of supplementation. *J. Sports Med. Phys. Fit.* **2005**, *45*, 337–346.
10. Svensson, M.; Malm, C.; Tonkonogi, M.; Ekblom, B.; Sjödin, B.; Sahlin, K. Effect of Q10 supplementation on tissue Q10 levels and adenine nucleotide catabolism during high-intensity exercise. *Int. J. Sport Nutr.* **1999**, *9*, 166–180. [[CrossRef](#)]
11. Arias, A.; García-Villoria, J.; Rojo, A.; Buján, N.; Briones, P.; Ribes, A. Analysis of coenzyme Q10 in lymphocytes by HPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *908*, 23–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Turunen, M.; Wehlin, L.; Sjöberg, M.; Lundahl, J.; Dallner, G.; Brismar, K.; Sindelar, P.J. β 2-integrin and lipid modifications indicate a non-antioxidant mechanism for the anti-atherogenic effect of dietary coenzyme Q10. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 255–260. [[CrossRef](#)]
13. Tomasetti, M.; Alleva, R.; Collins, A.R. In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1425–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Miles, M.V.; Tang, P.H.; Miles, L.; Steele, P.E.; Moye, M.J.; Horn, P.S. Validation and application of an HPLC-EC method for analysis of coenzyme Q10 in blood platelets. *Biomed. Chromatogr.* **2008**, *22*, 1403–1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Niklowitz, P.; Sonnenschein, A.; Janetzky, B.; Andler, W.; Menke, T. Enrichment of coenzyme Q10 in plasma and blood cells: Defense against oxidative damage. *Int. J. Biol. Sci.* **2007**, *3*, 257–262. [[CrossRef](#)]
16. Ormazabal, A.; Vilaseca, M.A.; Pérez-Dueñas, B.; Lambruschini, N.; Gómez, L.; Campistol, J.; Artuch, R. Platelet serotonin concentrations in PKU patients under dietary control and tetrahydrobiopterin treatment. *J. Inher. Metab. Dis.* **2005**, *28*, 863–870. [[CrossRef](#)]
17. Silva, A.M.; Oliveira, P.J. Evaluation of respiration with Clark type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *810*, 7–24. [[CrossRef](#)]
18. Yubero, D.; Montero, R.; Ramos, M.; Neergheen, V.; Navas, P.; Artuch, R.; Hargreaves, I. Determination of urinary coenzyme Q10 by HPLC with electrochemical detection: Reference values for a paediatric population. *BioFactors* **2015**, *41*, 424–430. [[CrossRef](#)]
19. Montero, R.; Sánchez-Alcázar, J.A.; Briones, P.; Hernández, Á.R.; Cordero, M.D.; Trevisson, E.; Salvati, L.; Pineda, M.; García-Cazorla, A.; Navas, P.; et al. Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 697–700. [[CrossRef](#)]
20. Montero, R.; Yubero, D.; Salgado, M.C.; González, M.J.; Campistol, J.; del O'Callaghan, M.M.; Pineda, M.; Delgadillo, V.; Maynou, J.; Fernandez, G.; et al. Plasma coenzyme Q10 status is impaired in selected genetic conditions. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 793. [[CrossRef](#)]
21. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Molyneux, S.L.; Florkowski, C.M.; Lever, M.; George, P.M. Biological variation of coenzyme Q10. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 455–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Duncan, A.J.; Heales, S.J.R.; Mills, K.; Eaton, S.; Land, J.M.; Hargreaves, I.P. Determination of coenzyme Q10 status in blood mononuclear cells, skeletal muscle, and plasma by HPLC with di-propoxy-coenzyme Q10 as an internal standard. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2380–2382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Montero, R.; Artuch, R.; Briones, P.; Nascimento, A.; García-Cazorla, A.; Vilaseca, M.A.; Sánchez-Alcázar, J.A.; Navas, P.; Montoya, J.; Pineda, M. Muscle coenzyme Q10 concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders. *BioFactors* **2005**, *25*, 109–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pravst, I.; Aguilera, J.C.R.; Rodriguez, A.B.C.; Jazbar, J.; Locatelli, I.; Hristov, H.; Žmitek, K. Comparative bioavailability of different coenzyme Q10 formulations in healthy elderly individuals. *Nutrients* **2020**, *12*, 784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Bentinger, M.; Dallner, G.; Chojnacki, T.; Swiezewska, E. Distribution and breakdown of labeled coenzyme Q10 in rat. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *34*, 563–575. [[CrossRef](#)]
27. Petrangolini, G.; Ronchi, M.; Frattini, E.; De Combarieu, E.; Allegrini, P.; Riva, A. A new food-grade coenzyme Q10 formulation improves bioavailability: Single and repeated pharmacokinetic studies in healthy volunteers. *Curr. Drug Deliv.* **2019**, *16*, 759–767. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Publicación 3

Título: *Laboratory diagnosis of a case with coenzyme Q₁₀ deficiency*

Autores: Abraham J. Paredes-Fuentes ^a, Natalia A. Julià-Palacios ^a, Raquel Montero ^a, Dèlia Yubero ^a, María V. Cascajo-Almenara ^{b,c}, Àngels García-Cazorla ^{a,c}, Carlos Santos-Ocaña ^{b,c} and Rafael Artuch ^{a,c}

^a Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Clinical Biochemistry, Paediatric Neurology and Genetics Departments, Barcelona, Spain; ^b Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain; ^c Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Referencia: Clinical Chemistry. 2020 Nov 1;66(11):1465-1467. doi:10.1093/clinchem/hvaa202

Clinical Chemistry 66:11
1465–1473 (2020)

the Clinical Chemist

Genetic Metabolic Series

Laboratory Diagnosis of a Case with Coenzyme Q₁₀ Deficiency

Abraham J. Paredes-Fuentes,^a Natalia A. Julià-Palacios,^a Raquel Montero,^a Dèlia Yubero,^a María V. Cascajo-Almenara,^{b,c} Àngels García-Cazorla,^{a,c} Carlos Santos-Ocaña,^{b,c} and Rafael Artuch^{a,c,*}

Clinical History and Background

Following an uneventful pregnancy, a boy was born from nonconsanguineous parents with no relevant family history. Within the first 24 hours after birth, he presented with cyanosis, lethargy, decreased spontaneous movements, hyperexcitability, and mild hypotonia. Under the suspicion of a mitochondrial disorder (MD), supplementation with different enzymatic cofactors was started, with no improvement. Refractory epilepsy, psychomotor delay, nystagmoid movements, and non-nephrotic range proteinuria were observed. The patient died at 9 months of age.

Venous blood analysis showed lactic acidosis. Lactate was also increased in cerebrospinal fluid (CSF): 3.74 mmol/L (reference interval [RI]: 1.11–2.22 mmol/L)). Impaired mitochondrial metabolism was further suggested by an increase of plasma alanine (797 µmol/L, RI: 190–337 µmol/L), CSF alanine (81 µmol/L, RI: 12–52 µmol/L) and an abnormal urine organic acid profile (increased excretion of succinate, fumarate, and 2-oxoglutarate). Increased concentrations of fibroblast growth factor-21 (FGF-21) (952 ng/L, RI: 0–300 ng/L) were detected. Analysis of coenzyme Q₁₀ (CoQ) by HPLC-electrochemical detection gave normal results in plasma, while a decrease in fibroblasts (36 nmol/g protein, RI: 91–151 nmol/g protein) and skeletal muscle was observed (56.2 nmol/g protein, RI: 110–480 nmol/g protein) (Fig. 1). The activity of mitochondrial

respiratory chain (MRC) succinate-cytochrome *c* reductase in fibroblasts, which depends on CoQ status, was reduced (9.04 nmol/min/mg protein) when compared with a control line of neonatal fibroblasts analyzed in parallel (16.01 nmol/min/mg protein).

Diagnosis and Summary

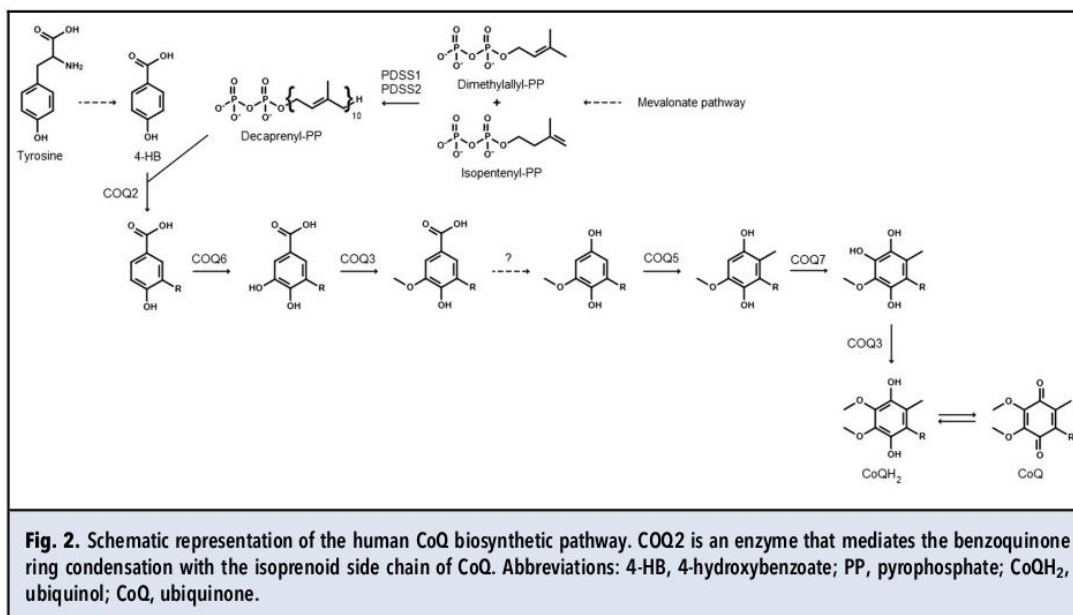
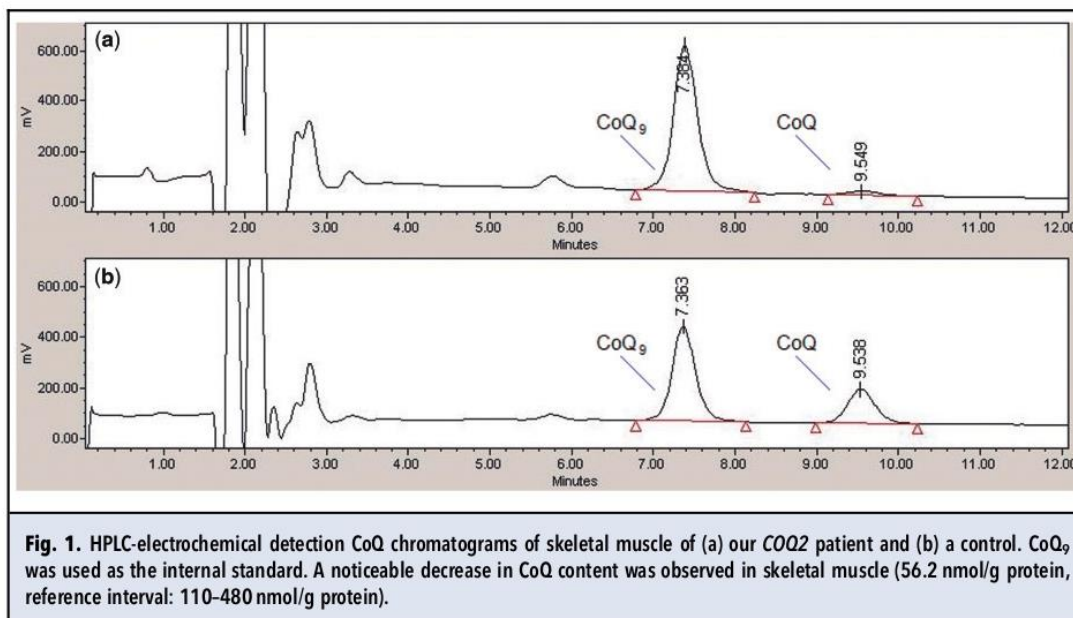
CoQ deficiency syndromes (ORPHA:35656) are heterogeneous MD that can be defined by the presence of reduced CoQ levels in tissues. CoQ displays a critical role in MRC function. Patients may be classified into two groups: 1) those with primary deficiencies, harboring biallelic autosomal recessive mutations in one of the genes involved in the CoQ biosynthesis (*COQ* genes), and 2) those with secondary forms, which are due to mutations in genes unrelated to CoQ biosynthesis or to nongenetic causes (such as some MD, methylmalonic aciduria, phenylketonuria, or statin therapy) (1). *COQ2* (OMIM:609825) encodes 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase (EC 2.5.1.39), an enzyme that plays a central role in CoQ biosynthesis (Fig. 2) (2, 3). The disease onset occurs in infancy or early childhood, and clinical manifestations range from isolated steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS), SRNS with encephalomyopathy, to a fatal neonatal multisystemic disease. Renal involvement is not a constant feature and may develop only after other manifestations, such as hypertrophic cardiomyopathy (4).

Mitochondrial energy metabolism biomarkers exhibit poor specificity for the diagnosis of MD. Next-generation sequencing technology is the best choice for diagnostic purposes. In our case, a clinical exome panel (6.710 genes) led to the identification of 2 heterozygous missense variants in *COQ2* (NM_015697.7): c.692G>T (p.Ser231Ile) and c.443G>A (p.Gly148Asp), being the father and the mother carriers for the first and the second variants, respectively. The variant c.692G>T affects a conserved residue among species, and is classified as of

^aInstitut de Recerca Sant Joan de Déu, Clinical Biochemistry, Paediatric Neurology and Genetics Departments, Barcelona, Spain ^bCentro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain ^cCentre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

*Address correspondence to this author at: Clinical Biochemistry Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, Esplugues de Llobregat, 08950 Barcelona, Spain. E-mail: rartuch@hsjdbcn.org.

Received April 23, 2020; accepted August 6, 2020
DOI: 10.1093/clinchem/hvaa202



uncertain significance (VUS) according to the American College of Medical Genetics classification guidelines. This variant appears in the Genome Aggregation Database (gnomAD) with an allele frequency of 0.00001627, and different predictors support a deleterious effect. The

variant c.443G>A is also classified as a VUS. It is not present in gnomAD, and it displays an uncertain verdict from the pathogenicity computational predictors. However, the extremely low allelic frequency, the results of the familial segregation studies, and the demonstrated

CoQ deficiency, all support the pathogenicity of both variants.

In the present case, biochemical measurements of CoQ status played an important role in diagnostic confirmation. It is advisable to analyze different biological samples, as a deficiency may remain undetected if the appropriate specimen is not chosen (4, 5). While our patient presented with a normal CoQ content in plasma, the diagnosis was confirmed by muscle and fibroblasts CoQ analysis (Fig. 1).

Ethical Issues: This submission complies with the Helsinki Declaration. The Ethics Committee of Sant Joan de Déu Hospital approved the study, and informed consent from patient's parents was obtained.

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 4 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; (c) final approval of the published article; and (d) agreement to be accountable for all aspects of the article thus ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the article are appropriately investigated and resolved.

Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the author disclosure form. Disclosures and/or potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: None declared.

Consultant or Advisory Role: None declared.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: None declared.

Research Funding: This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-FIS P117/00109 and P117/01286). A.J. Paredes-Fuentes, a grant from the Instituto de Salud Carlos III (FI18/00253).

Expert Testimony: None declared.

Patents: None declared.

References

1. Acosta MJ, Vazquez Fonseca L, Desbats MA, Cerqua C, Zordan R, Trevisson E, Salvati L. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2016;1857:1079–85.
2. GeneReviews-NCBI Bookshelf. Primary Coenzyme Q10 Deficiency. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK410087> (Accessed March 2020).
3. Forsgren M, Attersand A, Lake S, Grünler J, Swiezewska E, Dallner G, Climent I. Isolation and functional expression of human COQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *Biochem J* 2004;382:519–26.
4. Desbats MA, Lunardi G, Doimo M, Trevisson E, Salvati L. Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ10) deficiency. *J Inher Metab Dis* 2015;38:145–56.
5. Lagier-Tourenne C, Tazir M, López LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, et al. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 2008;82:661–72.

Capítulo 3: Desarrollar y validar un nuevo procedimiento para analizar las concentraciones de CoQ en plasma de pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial, para su posterior aplicación en otros especímenes biológicos para el diagnóstico de deficiencias de CoQ.

Publicación 4

Título: *Technical aspects of coenzyme Q₁₀ analysis: validation of a new HPLC-ED method*

Autores: Abraham J. Paredes-Fuentes ^{1,2,*}, Clara Oliva ², Raquel Montero ², Patricia Alcaide ^{3,4}, George J. G. Ruijter ⁵, Judit García-Villoria ^{1,4,6}, Pedro Ruiz-Sala ^{3,4} and Rafael Artuch ^{2,4}

¹ Division of Inborn Errors of Metabolism-IBC, Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; ² Clinical Biochemistry Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, 08950 Barcelona, Spain; ³ Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, Universidad Autónoma Madrid, IdiPAZ, 28049 Madrid, Spain; ⁴ Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; ⁵ Department of Clinical Genetics, Center for Lysosomal and Metabolic Diseases, Erasmus University Medical Center, 3015 GD Rotterdam, The Netherlands; ⁶ August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain. * Autor de correspondencia.

Referencia: Antioxidants (Basel). 2022 Mar 10;11(3):528. doi: 10.3390/antiox11030528



Article

Technical Aspects of Coenzyme Q₁₀ Analysis: Validation of a New HPLC-ED Method

Abraham J. Paredes-Fuentes ^{1,2,*}, Clara Oliva ², Raquel Montero ², Patricia Alcaide ^{3,4}, George J. G. Ruijter ⁵, Judit García-Villoria ^{1,4,6}, Pedro Ruiz-Sala ^{3,4} and Rafael Artuch ^{2,4}

- ¹ Division of Inborn Errors of Metabolism-IBC, Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clínic de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; jugarcia@clinic.cat
 - ² Clinical Biochemistry Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, 08950 Barcelona, Spain; clara.olivam@sjd.es (C.O.); raquel.montero@sjd.es (R.M.); rafael.artuch@sjd.es (R.A.)
 - ³ Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares, Universidad Autónoma Madrid, IdiPAZ, 28049 Madrid, Spain; patricia.alcaide@inv.uam.es (P.A.); prsala@cbm.csic.es (P.R.-S.)
 - ⁴ Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
 - ⁵ Department of Clinical Genetics, Center for Lysosomal and Metabolic Diseases, Erasmus University Medical Center, 3015 GD Rotterdam, The Netherlands; g.ruijter@erasmusmc.nl
 - ⁶ August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain
- * Correspondence: paredes@clinic.cat



Citation: Paredes-Fuentes, A.J.; Oliva, C.; Montero, R.; Alcaide, P.; Ruijter, G.J.G.; García-Villoria, J.; Ruiz-Sala, P.; Artuch, R. Technical Aspects of Coenzyme Q₁₀ Analysis: Validation of a New HPLC-ED Method. *Antioxidants* **2022**, *11*, 528. <https://doi.org/10.3390/antiox11030528>

Academic Editor: Stanley Omaye

Received: 24 January 2022

Accepted: 8 March 2022

Published: 10 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The biochemical measurement of the CoQ status in different tissues can be performed using HPLC with electrochemical detection (ED). Because the production of the electrochemical cells used with the Coulochem series detectors was discontinued, we aimed to standardize a new HPLC-ED method with new equipment. We report all technical aspects, troubleshooting and its performance in different biological samples, including plasma, skeletal muscle homogenates, urine and cultured skin fibroblasts. Analytical variables (intra- and inter-assay precision, linearity, analytical measurement range, limit of quantification, limit of detection and accuracy) were validated in calibrators and plasma samples and displayed adequate results. The comparison of the results of a new ERNDIM external quality control (EQC) scheme for the plasma CoQ determination between HPLC-ED (Lab 1) and LC-MS/MS (Lab 2) methods shows that the results of the latter were slightly higher in most cases, although a good consistency was generally observed. In conclusion, the new method reported here showed a good analytical performance. The global quality of the EQC scheme results among different participants can be improved with the contribution of more laboratories.

Keywords: coenzyme Q₁₀; HPLC with electrochemical detection; electrochemical cells; external quality control; ERNDIM

1. Introduction

Coenzyme Q₁₀ (CoQ) is a ubiquitous redox-active lipid in cell membranes and cholesterol transporter lipoproteins. It is composed of a benzoquinone ring and a polyisoprenoid side chain that comprises ten units in humans (Figure S1). CoQ is involved in several biological functions. It plays a critical role in mitochondrial respiratory chain function since it shuttles electrons from complexes I and II to complex III [1]. CoQ also acts as a potent membrane antioxidant and is involved in many other cellular processes, including the modulation of the mitochondrial permeability pores and activation of mitochondrial uncoupling proteins [2].

CoQ deficiencies can be defined by the decrease in CoQ levels in biological samples. Given its essential functions, a deficit in this molecule is associated with various inherited or acquired pathological conditions, which are classified as primary (due to mutations in genes involved in the biosynthesis of CoQ) or secondary (due to mutations in genes

unrelated to CoQ biosynthesis or to nongenetic causes) CoQ deficiencies [3–5]. Thus, the biochemical demonstration of CoQ deficiency in biological samples has clinical value, since it enables early treatment initiation and may change the natural history of patients with CoQ deficiency [6].

The CoQ content can be analysed in different human biological specimens, where plasma, skeletal muscle, and cultured skin fibroblasts are the most common samples to detect the CoQ deficiency status. The analysis of other samples has also been reported, such as urinary cells, blood mononuclear cells (BMCs), platelets and cerebrospinal fluid (CSF) [7].

The gold standard procedure for biochemical identification of CoQ deficiencies is the measurement of CoQ levels in the above-mentioned biological samples by high-performance liquid chromatography (HPLC). Two main detection systems are commonly used: ultraviolet (UV) and electrochemical (ED) detectors. The first reported methods were based on UV detection, in which CoQ was quantified at 275 nm [8,9]. As ubiquinol (reduced form of CoQ) could not be determined by these procedures because of its low molar absorptivity, HPLC-ED methods were developed [10,11]. Many of them have been reported, using either coulometric or amperometric detectors [12,13]. Some methods based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) have also been reported, with comparable results to HPLC-ED regarding selectivity and sensitivity [14,15]. Other procedures, including fluorescence and chemiluminescence measurements, have also been developed [16,17].

HPLC-ED has significant advantages because it is a more sensitive procedure than UV; thus, it yields more accurate results, and only a minimal sample amount is required. Moreover, it enables the simultaneous detection of both reduced and oxidized forms of CoQ (ubiquinol and ubiquinone, respectively) [18]. For years, many studies relied on the use of the ESA Coulochem ED and their analytical and guard cells for different purposes, including CoQ determination. However, because the production of electrochemical cells was discontinued, this detector is no longer available in most laboratories.

We aimed to standardize a new HPLC-ED procedure for CoQ determination using Thermo Scientific equipment with new electrochemical cells, detail all technical aspects and troubleshooting, and assess its performance in different biological specimens. We also aimed to assess our participation in a new external quality control (EQC) scheme for plasma CoQ determination and compare our results with those obtained using an LC-MS/MS method.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Samples from patients with suspected and confirmed plasma CoQ deficiencies and controls were used for this study. The following biological specimens were analysed: plasma, skeletal muscle homogenates, urine and cultured skin fibroblasts.

Plasma samples: Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) and heparin blood samples were drawn to separate plasma by centrifugation ($1500\times g$, 10 min, 4°C). The samples were stored at -80°C until CoQ analysis.

Muscle samples: Skeletal muscle samples were weighed and homogenized with cold SETH buffer (250 mmol/L sucrose, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, 5×10^4 IU/L heparin) in an ice bath. Then, the mixture was transferred to a polypropylene tube, followed by vortexing for 2 min, sonication for 5 min, and centrifugation ($1500\times g$, 10 min, 4°C). The supernatant was frozen at -80°C until CoQ analysis.

Urine samples: A minimum volume of 30 mL of first morning urine samples was collected in standard urine containers, as previously reported [19]. After centrifugation ($1500\times g$, 10 min, 4°C), the urinary pellet was washed with 9 mg/mL saline solution and subsequently centrifuged as before to remove urinary proteins. The urinary pellet was stored frozen at -80°C until CoQ analysis.

Fibroblasts: Skin fibroblasts were cultured according to standard procedures. The cells were washed twice with 1X PBS and, subsequently, detached from the flasks with trypsin solution. After trypsin inactivation, the cell suspension was centrifuged ($500\times g$, 5 min), and the cell pellet was resuspended in 300 μL of PBS. The homogenized cultured fibroblasts were frozen at -80°C until CoQ analysis.

2.2. Method

The CoQ content in different biological specimens was analysed by HPLC using an UltiMate 3000 UHPLC system coupled with electrochemical detection (model ECD-3000RS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Two coulometric cells were used: 6020RS (preanalytical cell or guard cell) and 6011RS (analytical cell) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Calibrator (1.16 $\mu\text{mol/L}$ CoQ in ethanol) (Supelco, Darmstadt, Germany), control (reference 0092, Chromsystems, Gräfelfing, Germany), and biological samples were similarly prepared. A flowchart of the general analysis workflow with marks on the timing is depicted in Figure S2. Fifty microlitres of samples were used in all cases, except for urine samples (100 μL). Twenty microlitres of internal standard (5 $\mu\text{mol/L}$ coenzyme Q₉ (CoQ₉) in ethanol) (Fluka, Loughborough, UK) were added to all samples. After deproteinization with 500 μL of ethanol, 2 mL of hexane was added to extract both CoQ₉ and CoQ by vortexing for 10 min. After centrifugation at $1500\times g$ (10 min, 4°C), the hexane phase was collected, filtered using a 0.22 μm filter, evaporated to dryness under a nitrogen stream, and redissolved in 200 μL of methanol/isopropanol (65:35, *v/v*). The mobile phase consisted of 10 mmol/L ammonium acetate (for LC-MS LiChropur, Merck, Darmstadt, Germany) in methanol/isopropanol (65:35, *v/v*) (Fisher Scientific, Loughborough, UK). Both organic solvents were of electrochemical grade and filtered using a 0.45 μm filter prior to their use. We also tested the mobile phase that our group previously used with the ESA Coulochem II ED, which consisted of 1.06 g/L lithium perchlorate in methanol/ethanol (60:40, *v/v*) [20]. CoQ was separated in a BDS Hypersil C18 column (length and internal diameter: $150\times 3\text{ mm}$, particle size: 3 μm , Thermo Fisher Scientific); then, it was quantified by ED using CoQ₉ as the internal standard. The guard cell was set at -700 mV , while the analytical cell was set at -700 mV and $+600\text{ mV}$. The flow rate was 0.5 mL/min, and the injection volume was 30 μL . The total analytical run time was 10 min.

To estimate the cell content of muscle homogenates, urine cell pellet and skin fibroblast samples, the total protein concentration was determined by the Lowry method [21]. CoQ values were normalized to the total protein concentration in those specimens.

2.3. Validation Procedure

The following parameters were calculated to validate the method:

- (1) The intra-assay precision was assessed using 20 replicates of 2 plasma pools with different CoQ concentrations (0.3 $\mu\text{mol/L}$ and 1 $\mu\text{mol/L}$). Plasma samples with known CoQ values were used to prepare the pools. Data were reported as the coefficient of variation (CV), which was calculated as follows: $(\text{SD}/\text{mean})\times 100$, where SD is standard deviation.
- (2) The inter-assay precision was calculated by analysing a plasma control material (0.74 $\mu\text{mol/L}$, reference 0092, Chromsystems) for 10 days. Data were reported as CV.
- (3) The linearity, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) were calculated using serial dilutions of a standard solution, which covered the typically observed range of CoQ concentrations (low to high) in cases of CoQ deficiencies and patients under oral CoQ treatment. The LOQ was calculated as $(10\times\text{SD of the response})/\text{slope}$, and LOD as $(3.3\times\text{SD of the response})/\text{slope}$. The analytical measurement range (AMR) was assessed by analysing ten times five plasma samples covering very low plasma CoQ values (0.12 $\mu\text{mol/L}$), moderate deficiency (0.3 $\mu\text{mol/L}$), normal values (0.74 $\mu\text{mol/L}$ and 1 $\mu\text{mol/L}$), and very high values due to CoQ supplementation (5.6 $\mu\text{mol/L}$).
- (4) The accuracy was assessed in two ways: (a) by comparison of 54 samples with the method previously used by our group with the ESA Coulochem II ED [20], and

(b) by laboratory intercomparison for 2 years (2020 and 2021). In 2020, an EQC pilot scheme for plasma CoQ measurement was launched by ERNDIM (European Research Network for Evaluation and Improvement of Screening, Diagnosis and Treatment of Inherited Disorders of Metabolism: www.erndim.org, accessed 9 December 2021). The main goal of this foundation is to provide different quality assurance schemes in laboratory testing for inborn errors of metabolism, and the ultimate objective is to reach a consensus on reliable and standardized procedures for diagnosis [22]. Among different ERNDIM schemes, CoQ was included in the “Special Assays in Serum” (SAS) scheme. Samples were prepared on lyophilized plasma matrices, and four different amounts of CoQ were added in duplicate to cover low, medium and high CoQ values. These amounts were unknown for all participants. In total, 8 samples were sent annually to the participants, who reported their results using the ERNDIM website. Once reported, the results were analysed and different metrological parameters were sent back to the participants at the end of the year, including the accuracy and global interlaboratory variation (see Section 3.2 and Supplementary Material 1).

2.4. LC-MS/MS Method

The results of the EQC scheme for plasma CoQ determination were compared with those generated from an HPLC-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-APCI-MS/MS) method [23]. Briefly, 50 μ L of 2.5 μ mol/L CoQ₉ (used as the internal standard) and 50 μ L of 2 mg/mL *p*-benzoquinone (used to oxidize all forms of CoQ in the samples) were added to the plasma matrix. After 15 min incubation at room temperature, 850 μ L of 1-propanol was added, and the mixture was centrifuged (20,000 $\times$ g, 15 min, 4 °C). The supernatants were transferred to a glass tube and evaporated to dryness under a nitrogen stream. The dried extracts were resuspended in a water/1-propanol (2:8) solution. A calibration curve was prepared with CoQ concentrations ranging from 0.02 to 12 μ mol/L. The samples were injected into an Agilent 1290/AB Sciex 4500 LC-MS/MS device. CoQ₉ and CoQ were separated using a Symmetry C18 HPLC column (Waters, Milford, USA) with a 2-propanol/methanol/formic acid (50:50:0.1) mobile phase and acquired by multiple reaction monitoring (MRM) in the positive mode (CoQ₉: m/z = 796 $\rightarrow$ 197, CoQ: m/z = 864 $\rightarrow$ 197).

2.5. Statistical Analyses

Spearman’s correlation coefficient was calculated using IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Passing–Bablok regression was performed using MedCalc for Windows, version 20.023 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

3. Results

3.1. Optimization of the Method and Performance in Different Biological Samples

Regarding the chromatographic conditions of the new method, when we first attempted to standardize a procedure for the UltiMate 3000 UHPLC system using a 6011RS electrochemical cell and a mobile phase similar in composition to those previously reported by our group (which contained lithium perchlorate), we observed a dramatic loss of response in the cell after only a few runs. Chromatograms showing this situation are displayed in Figure 1.

Different procedures were performed to recover the cell response, including electrochemical clean-up (application of a potential of +1.000 mV to the cell for up to 10 min with mobile phase flowing) and extensive cleaning of the cell, as indicated by manufacturers, but none of them completely restored the cell performance. Moreover, the use of a preanalytical cell or guard cell (model 6020RS) to electrochemically clean the mobile phase and samples that arrived at the analytical cell, or the exclusive use of electrochemical-grade solvents, did not improve this situation. Thus, we decided to change this mobile phase containing lithium perchlorate to a phase containing ammonium acetate. A gradual loss in cell performance was still observed but was not as remarkable as described before, since it occurred over several runs (Figure S3a). The procedure was further optimized after an

electrochemical treatment of the cells after each run (Figure S3b). This treatment consisted of applying a potential of +1.000 mV to the cells for 10 s and, subsequently, equilibrating them for 10 min (the potentials for each cell are described in Section 2.2).

Once we optimized the new method, we assessed its performance in different biological samples. As an example, typical chromatograms from different specimens (calibrator, plasma, muscle homogenate, urine and skin fibroblasts) are depicted in Figure 2. A head-to-head comparison of 54 samples was used to compare the new procedure with the procedure previously used by our group with the ESA Coulochem II ED [20]. Passing–Bablok regression showed no differences between the two methods: the intercept and slope with their 95% confidence intervals were $-0.01(-0.02-0)$ and $1.03(1-1.06)$, respectively; the cumulative sum linearity test p value was 0.3, which indicates no significant deviation from linearity (Figure S4). Therefore, the data obtained with this new procedure were consistent with the previous procedure, and we maintained our reference values [20,24], which were similar to those reported in the literature by other groups [25–27].

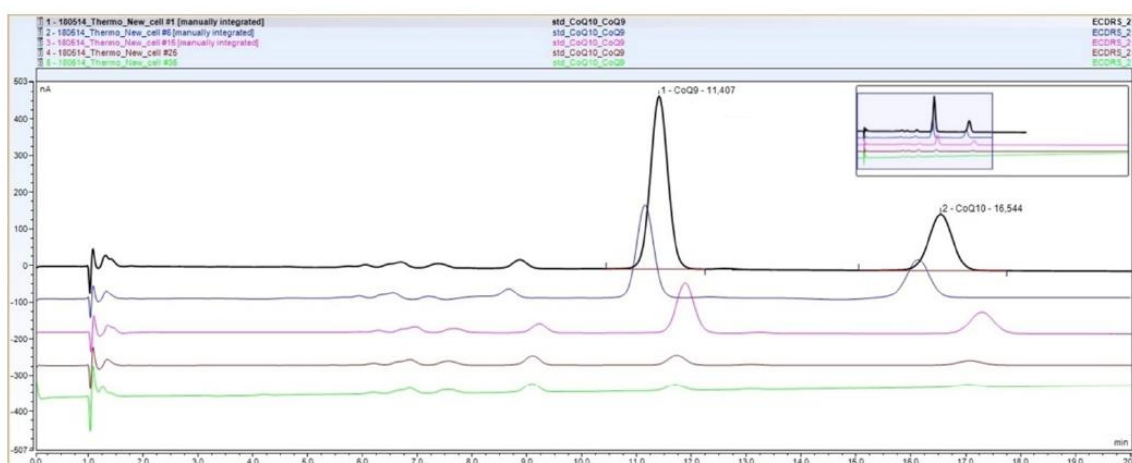


Figure 1. Chromatograms of a calibrator solution (which contained coenzyme Q₉ (CoQ₉) and coenzyme Q₁₀ (CoQ)) showing the loss of response in the 6011RS electrochemical cell. The same sample was injected 6 (blue), 15 (pink), 25 (brown) and 35 (green) times.

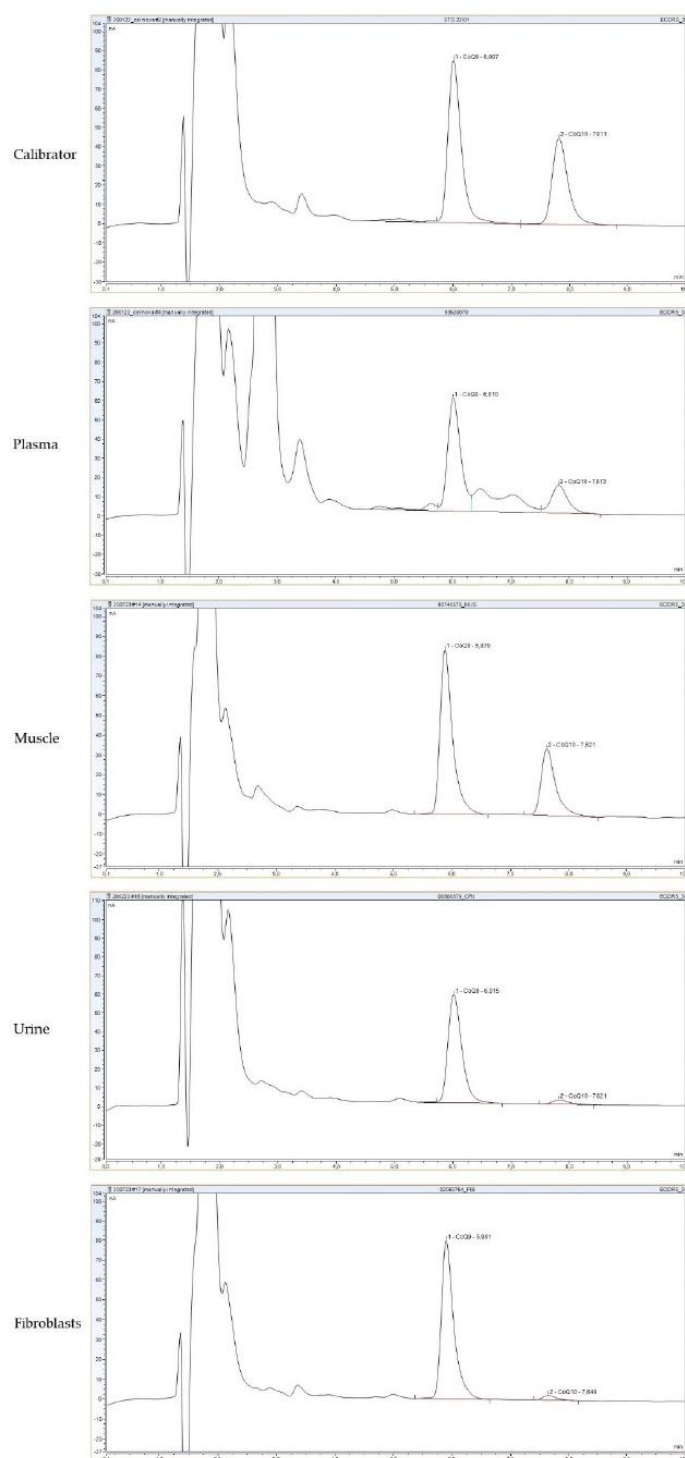


Figure 2. Typical chromatograms of CoQ determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) in different specimens: calibrator, plasma, muscle homogenate, urine and skin fibroblasts. CoQ₉ was used as the internal standard.

3.2. Analytical Validation of the Method and EQC Scheme Results

The analytical parameters obtained in the validation study are reported in Table 1.

Table 1. Validation parameters of the new HPLC-ED method for CoQ analysis. Accuracy is expressed as % recovery, and its standard deviation is indicated in brackets. Abbreviations: AMR, analytical measurement range; LOQ, limit of quantification; LOD, limit of detection.

Validation Parameters	
Intra-assay precision (%)	
0.3 µmol/L	6.48
1 µmol/L	6.10
Inter-assay precision (%)	
0.74 µmol/L	8.85
Linearity (µmol/L)	0.06–7.07
r^2	0.999
AMR (µmol/L)	0.12–5.60
LOQ (µmol/L)	0.06
LOD (µmol/L)	0.02
Accuracy	100.6 (6.62)

The accuracy reported in Table 1 was calculated by a comparison of 54 samples with the earlier HPLC-ED method previously used by our group and expressed as % recovery. Concerning the accuracy and laboratory intercomparisons, all ERNDIM SAS scheme reports from 2020 and 2021 were analysed. As an example, a typical report of the results of one sample from 13 participants is shown in Supplementary Material 2. Although three methods were used (HPLC-UV-6 laboratories, HPLC-ED-5 laboratories, and LC-MS/MS-2 laboratories) with few participants, a good consistency among the laboratories was observed in that individual report. The global performance of all participants in 2020 and 2021 is shown in Table 2. Details of how different metrological variables were calculated are presented in Supplementary Material 1. For example, the accuracy was reported as the mean outcome of the eight samples. In our case, the mean values detected (2020—0.860 µmol/L, 2021—1.34 µmol/L) were consistent with those reported from all participants (Supplementary Table S1). Since different methods were used, we can consider that the accuracy of our method (calculated as % deviation) was acceptable. In general, the quality of the other results from all participants in the EQC scheme was not optimal, including a low precision and recovery. However, a remarkable improvement in interlaboratory CV was observed in 2021 in comparison to the 2020 performance.

Table 2. Global performance of all participants in the new external quality control (EQC) scheme for the plasma CoQ determination. For different metrological variables, mean values from all participants are provided, which were obtained from the annual reports during the 2020–2021 period. Abbreviations: CV, coefficient of variation.

	2020 (<i>n</i> = 11)	2021 (<i>n</i> = 13)
Mean values detected (µmol/L)	0.757	0.901
Precision (CV of the duplicates, %)	52.7	50.5
Linearity (<i>r</i>)	0.782	0.664
Recovery (% of added CoQ)	27	26
Interlaboratory CV (%)	141	82.2

3.3. Method Comparison

The results of the EQC scheme obtained with the new HPLC-ED method (Lab 1), HPLC-APCI-MS/MS procedure (Lab 2), and from all participants are stated in Table 3 and

depicted in Figure 3. The results of one sample (SAS2021.06) were not reported by Lab 1, since interferences were observed in the chromatogram.

Table 3. Results of the EQC scheme obtained with the HPLC-ED (Lab 1) and LC-MS/MS (Lab 2) methods, and from all participants. Mean values are stated for (Lab 1) and (Lab 2), while median values are reported for all participants. All data are expressed in $\mu\text{mol/L}$. Abbreviations: LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry; NR, not reported.

	Duplicate	Lab 1 (HPLC-ED)	Lab 2 (LC-MS/MS)	All Participants
SAS2020.01	1	1.4	0.41	1.2
SAS2020.02	2	0.41	0.43	0.43
SAS2020.03	3	0.22	0.36	0.34
SAS2020.04	4	1.1	1.9	1.1
SAS2020.05	4	1.9	2.2	2.0
SAS2020.06	3	0.18	0.33	0.32
SAS2020.07	1	1.2	1.5	1.2
SAS2020.08	2	0.49	0.61	0.54
SAS2021.01	1	0.21	0.32	0.27
SAS2021.02	2	0.69	0.62	0.69
SAS2021.03	3	0.59	0.94	0.92
SAS2021.04	4	0.60	0.67	0.57
SAS2021.05	1	0.14	0.30	0.27
SAS2021.06	3	NR	0.97	1.2
SAS2021.07	2	1.7	1.9	1.5
SAS2021.08	4	0.51	0.53	0.53

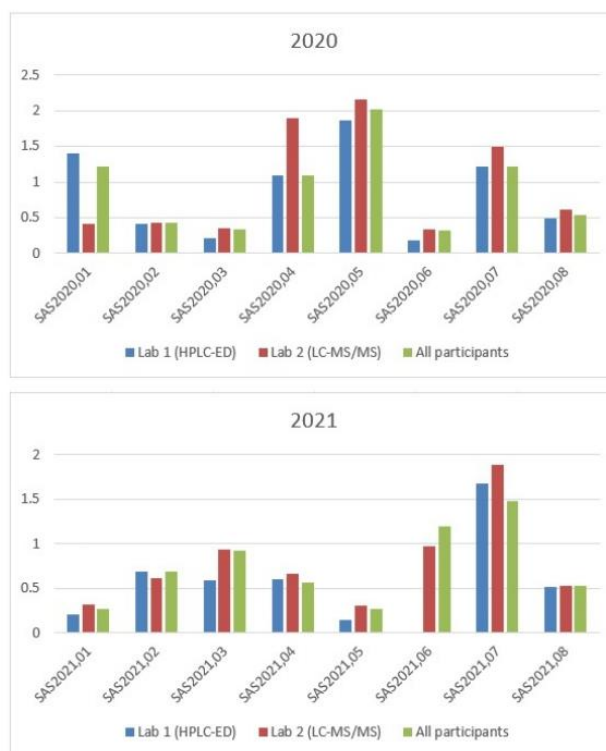


Figure 3. Visual comparison of the results of the EQC scheme for the plasma CoQ determination obtained with the HPLC-ED (Lab 1) and LC-MS/MS (Lab 2) methods, and from all participants during the 2020–2021 period. Mean values are stated for (Lab 1) and (Lab 2), while median values are reported for all participants. All data are expressed in $\mu\text{mol/L}$.

Due to the low number of samples analysed, Spearman's correlation coefficient was used to search for correlations between the two methods and between each method and the results reported by all participants. A significant positive correlation was observed in all cases (HPLC-ED vs. LC-MS/MS: $r = 0.842$, $p < 0.001$; HPLC-ED vs. all participants: $r = 0.979$, $p < 0.001$; and LC-MS/MS vs. all participants: $r = 0.873$; $p < 0.001$). In most cases, as depicted in Figure 3, the results obtained with the LC-MS/MS method were slightly higher than those obtained with the HPLC-ED procedure, although a good concordance was generally observed between them.

4. Discussion

CoQ levels can be analysed in different human biological samples. Skeletal muscle has been considered the gold standard for investigating CoQ status for many years, but it has limitations, the most significant limitation being that muscle biopsy is an invasive procedure, and it cannot be used for treatment monitoring purposes. Fibroblasts can be obtained from a much-less-invasive procedure, and they enable functional studies to be performed. However, they also have limitations: some false negative results have been reported in patients with muscle CoQ deficiency [28]. Urine is a non-invasive sample, and it has been suggested to be useful as a surrogate biomarker of the kidney CoQ status, although this correlation remains to be demonstrated. Plasma has several advantages, since it represents a minimally invasive sample, and decreased levels of plasma CoQ may reliably indicate secondary deficiencies. However, plasma CoQ can be influenced by both dietary intake and lipoprotein concentrations; thus, it is not recommended for the diagnosis of primary CoQ deficiencies. The measurement of CoQ in lymphocytes can also be useful for diagnosis if the patient has not received CoQ supplementation [29]. Regarding CoQ treatment monitoring, we previously reported that among a wide array of biological samples, plasma appeared to be the best specimen for this purpose, since the CoQ determination in cells (such as BMCs, platelets and urinary cells) requires extensive preanalytical preparation and may display high biological variation [24].

HPLC-ED is both selective and sensitive, which makes it an ideal tool to measure low levels of analytes in complex matrices. Selecting specific operating potentials can result in the selective detection of a compound from a multicomponent mixture. This technique relies on the electroactive nature of compounds that can be oxidized or reduced, and it provides highly sensitive and selective analyses for a wide range of biological and pharmaceutical compounds. Our group reported a procedure for CoQ determination in serum by HPLC-ED almost two decades ago [30]. Since then, we reported CoQ determination in other biological specimens, including muscle, fibroblasts, urine, platelets and BMCs [19,20,24]. All of these procedures were based on the use of the ESA Coulochem II ED. However, since the production of the electrochemical cells used with this detector was discontinued some years ago, a new procedure for CoQ determination using new equipment was necessary.

All previous procedures for CoQ determination that our group and other authors reported used a mobile phase containing lithium perchlorate, which is an electrolyte salt with strong oxidizing properties. Thus, the dramatic loss of response that we observed in the new cells (Figure 1) may result from the chemical damage of the electrodes, as noted by Lee et al. [31]. A previous report used this approach, but few samples were analysed [32]. This application may work under these conditions, as the authors demonstrate, but it is probably not reliable for the clinical analysis of large series of CoQ analyses in different biological samples. The use of ammonium acetate, which is a salt routinely used in many laboratories for different HPLC-ED and mass spectrometry procedures [33,34], instead of lithium perchlorate, was essential for optimizing the procedure of CoQ determination. It is well known that the use of highly pure solvents and chemicals in the mobile phase is crucial for minimizing the contamination of the ED [35]. In our case, filtered electrochemical-grade solvents and ammonium acetate of the highest purity available must be used to optimize the procedure and avoid the loss of response in the cell. Trace levels of electroactive impurities may significantly increase background noise and cause permanent cell damage.

Thus, it is of great importance that the solvents and samples are filtered before use and a filter must be placed before the flow-through cells. In our case, two graphite filters were used at pre- and post-injector locations (models 70–0898 and 70–3824, respectively).

The 6011RS coulometric cell contains two working electrodes, which provide the surface area for the electrochemical reaction. In this model, the electrode surfaces are smaller than those of the cells in the ESA Coulochem II ED, so we hypothesize that its lifetime is shorter, i.e., it allows shorter periods of operation without a reduction in signal. In the analytical cell, components are reduced at the first electrode and, subsequently, oxidatively measured at the second electrode. This reversal is employed to improve selectivity since many common interferences are greatly reduced or eliminated. However, the use of a preanalytical cell or guard cell is recommended because it helps eliminate many electroactive, undesirable and interfering compounds from subsequent detection in the analytical cell. In our case, the electrochemical clean-up of the cells after every single run was also essential to maintain the cell performance over time (Figure S3).

An analytical validation of the present method was assessed after calculating different validation parameters in Section 3.2 and demonstrated a good analytical performance. The obtained CVs were lower than 10%, which is appropriate for the clinical assessment of the CoQ status. Indeed, the procedure was accredited by ENAC (Spanish National Accreditation Body) according to the UNE-EN ISO 15,189 norm for medical laboratories. Furthermore, the AMR covered a wide range of CoQ concentrations, including severe deficiencies or high CoQ values due to oral CoQ treatment. Regarding medical decision limits, there is no general consensus. We can consider the lowest limit of the reference interval (around 0.4 $\mu\text{mol/L}$) the limit to detect plasma CoQ deficient status. This value is inside the AMR for the developed method. Regarding the highest CoQ values, there is not a clear medical decision limit since these values are only observed when patients are under CoQ supplementation. Once again, there is no consensus about which plasma CoQ values are advisable for treatment monitoring. The total analytical run time was 10 min for all types of biological specimens. Although the reported method is faster than our previously reported procedures for CoQ determination [24], we had to electrochemically clean the cells after every run to improve the lifetime of the cells; thus, the final total run time (20 min) was equivalent to our previous methods.

Regarding the ERNDIM EQC scheme results, the global quality was not good. While individual reports from all participants usually offered good results, as observed in Supplementary Material 1, the global performance assessed at the end of every year presented some low-quality outcomes, as shown in Table 2. The most plausible explanation for this is that this scheme was new, and few participants were involved. More than 200 laboratories participated in some ERNDIM schemes, but only 11 and 13 participants were registered for plasma CoQ determination in 2020 and 2021, respectively. Furthermore, three different technologies were employed, which probably increased the variability among laboratories. In this regard, we compared our results (Lab 1) with those reported by (Lab 2), as LC-MS/MS methods represent the most widely used assays in recent years for the study of inborn errors of metabolism. Only two participants reported using an LC-MS/MS method in the 2021 scheme, which makes it difficult to draw a conclusion, although we observed slightly higher results for this procedure (Lab 2) than our HPLC-ED method (Lab 1). Other issues deserve further investigation, such as CoQ instability in the lyophilized matrix, which may explain the low overall analyte recovery, or the presence of interferences that can mainly affect UV and ED systems. In any case, one of the most important metrological variables, which is the global interlaboratory variation (calculated as CV), was significantly reduced from 2020 to 2021 (Table 2).

Some limitations of our study include the fact that the validation of the method was carried out for plasma samples and that we did not study other characteristics, such as the matrix effect. Although we assessed the performance of the new method in different biological specimens, including all specimens that are usually analysed in clinical laboratories for diagnosis and monitoring purposes, the validation study was performed only

for plasma samples due to the difficulties of having large series of muscle and fibroblasts samples. However, this method has proven to be useful to detect primary CoQ deficiencies in muscle [36], and especially for treatment monitoring purposes, where plasma samples are thought to be the best biological samples [24]. Finally, a low CoQ solubility and stability and the use of adequate matrices in calibrators and controls are critical issues that deserve further investigation.

5. Conclusions

We report the validation of a new HPLC-ED method for CoQ analysis in plasma samples that can be used for CoQ analysis in other biological samples using a Thermo Scientific apparatus. The optimization of this method shows that the mobile phase containing lithium perchlorate was not appropriate for the analysis of a large series of samples, since the lifetime of the electrochemical cells was brief, at least in our study. The analytical performance of the present method was successful. We also compared the results of a new EQC scheme for the plasma CoQ determination using our method and an LC-MS/MS procedure. Regarding the EQC scheme performance among different participants, some degree of improvement was observed in 2021, but the participation of more laboratories appears to be mandatory to ascertain the better quality and utility of this new ERNDIM scheme.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox11030528/s1>, Supplementary Material 1: Explanation of the annual report of the ERNDIM external quality control (EQC) scheme for the plasma coenzyme Q₁₀ (CoQ) determination, including how different metrological variables are calculated.; Supplementary Material 2: Example of a typical report of the results of one sample from different participants in the EQC scheme for the plasma CoQ determination; Figure S1: Chemical structure of coenzyme Q₁₀; Figure S2: Flowchart of the general workflow for CoQ analysis in different biological samples, with marks on the timing required for a technician with HPLC skills; (Figure S3a): Analysis of a calibrator solution before complete optimization of the method; (Figure S3b): Analysis of a pool of plasma samples with a further optimized method, which included an electrochemical treatment of cells after each run; (Figure S4): Passing–Bablok regression analysis of the two HPLC-ED methods; Supplementary Table S1: Accuracy assessed by laboratory intercomparison.

Author Contributions: Conceptualization, A.J.P.-F. and R.A.; methodology, A.J.P.-F., J.G.-V. and P.R.-S.; validation, A.J.P.-F., C.O., R.M., P.A. and P.R.-S.; formal analysis, A.J.P.-F., G.J.G.R., P.R.-S. and R.A.; investigation, A.J.P.-F., C.O., R.M., P.A.; resources, P.R.-S. and R.A.; data curation, A.J.P.-F.; writing—original draft preparation, A.J.P.-F. and R.A.; writing—review and editing, all authors; visualization, A.J.P.-F., J.G.-V. and P.R.-S.; supervision, G.J.G.R. and R.A.; funding acquisition, R.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has been funded by the “Instituto de Salud Carlos III” (PI20/00340) (co-funded by European Regional Development Fund “A way to make Europe”), FEDER 2014–2020, and “Asociación de Enfermos de Patologías Mitocondriales (AEPMI)”. CIBERER is an initiative from the “Instituto de Salud Carlos III”. A.J.P.-F. held a grant from the “Instituto de Salud Carlos III” (FI18/00253) and from the “Asociación de Enfermos de Patologías Mitocondriales (AEPMI)/Fundación Ana Carolina Díez Mahou”.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Sant Joan de Déu (HSJD) (reference PIC-97-16) and it was conducted according to the guidelines established in the WMA Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: The samples from patients and controls were donated by the HSJD Biobank, and they provided written informed consent from patients or their parents.

Data Availability Statement: The data are contained within the article and supplementary materials.

Acknowledgments: Authors acknowledge the use of data derived from ERNDIM EQC materials in this article. The use of ERNDIM EQC materials does not imply that ERNDIM endorses the methods used or the scientific validity of the findings in this article. ERNDIM is an independent, not-for-profit foundation that provides EQC schemes in the field of inborn errors of metabolism with the aim of improving diagnosis, treatment and monitoring of inherited metabolic diseases.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Turunen, M.; Olsson, J.; Dallner, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1660*, 171–199. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Trevisson, E.; Dimauro, S.; Navas, P.; Salviati, L. Coenzyme Q deficiency in muscle. *Curr. Opin. Neurol.* **2011**, *24*, 449–456. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Quinzii, C.M.; Hirano, M. Primary and secondary CoQ10 deficiencies in humans. *BioFactors* **2011**, *37*, 361–365. [\[CrossRef\]](#)
4. Emmanuele, V.; López, L.C.; Berardo, A.; Naini, A.; Tadesse, S.; Wen, B.; D’Agostino, E.; Solomon, M.; DiMauro, S.; Quinzii, C.; et al. Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: Patient study and literature review. *Arch. Neurol.* **2012**, *69*, 978–983. [\[CrossRef\]](#)
5. Alcázar-Fabra, M.; Trevisson, E.; Brea-Calvo, G. Clinical syndromes associated with coenzyme Q10 deficiency. *Essays Biochem.* **2018**, *62*, 377–398. [\[CrossRef\]](#)
6. Desbats, M.A.; Lunardi, G.; Doimo, M.; Trevisson, E.; Salviati, L. Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ10) deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2014**, *38*, 145–156. [\[CrossRef\]](#)
7. Hargreaves, I.; Heaton, R.A.; Mantle, D. Disorders of Human Coenzyme Q10 Metabolism: An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6695. [\[CrossRef\]](#)
8. Abe, K.; Ishibashi, K.; Ohmae, M.; Kawabe, K.; Katsui, G. Determination of ubiquinone in serum and liver by high-speed liquid chromatography. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1978**, *24*, 555–567. [\[CrossRef\]](#)
9. Ogasahara, S.; Engel, A.G.; Frens, D.; Mack, D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2379–2382. [\[CrossRef\]](#)
10. Okamoto, T.; Fukunaga, Y.; Ida, Y.; Kishi, T. Determination of reduced and total ubiquinones in biological materials by liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **1988**, *430*, 11–19. [\[CrossRef\]](#)
11. Grossi, G.; Bargossi, A.M.; Fiorella, P.L.; Piazzi, S.; Battino, M.; Bianchi, G.P. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of coenzyme Q10 in plasma. *J. Chromatogr.* **1992**, *593*, 217–226. [\[CrossRef\]](#)
12. Barshop, B.A.; Gangoiiti, J.A. Analysis of coenzyme Q in human blood and tissues. *Mitochondrion* **2007**, *7*, S89–S93. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Lai, J.F.; Franke, A.A. Analysis of circulating lipid-phase micronutrients in humans by HPLC: Review and overview of new developments. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, *931*, 23–41. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Hansen, G.; Christensen, P.; Tüchsen, E.; Lund, T. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q10 in human serum by negative APCI LC-MS. *Analyst* **2004**, *129*, 45–50. [\[CrossRef\]](#)
15. Ruiz-Jiménez, J.; Priego-Capote, F.; Mata-Granados, J.M.; Quesada, J.M.; Luque de Castro, M.D. Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1175*, 242–248. [\[CrossRef\]](#)
16. Turkowicz, M.J.; Karpínska, J. Analytical problems with the determination of coenzyme Q10 in biological samples. *Biofactors* **2013**, *39*, 176–185. [\[CrossRef\]](#)
17. Kishikawa, N.; Kuroda, N. Analytical techniques for the determination of biologically active quinones in biological and environmental samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *87*, 261–270. [\[CrossRef\]](#)
18. Rodríguez-Aguilera, J.; Cortés, A.; Fernández-Ayala, D.; Navas, P. Biochemical assessment of coenzyme Q10 deficiency. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 27. [\[CrossRef\]](#)
19. Yubero, D.; Montero, R.; Ramos, M.; Neergheen, V.; Navas, P.; Artuch, R.; Hargreaves, I. Determination of urinary coenzyme Q10 by HPLC with electrochemical detection: Reference values for a paediatric population. *BioFactors* **2015**, *41*, 424–430. [\[CrossRef\]](#)
20. Montero, R.; Sánchez-Alcázar, J.A.; Briones, P.; Hernández, Á.R.; Cordero, M.D.; Trevisson, E.; Salviati, L.; Pineda, M.; García-Cazorla, A.; Navas, P.; et al. Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin. Biochem.* **2008**, *41*, 697–700. [\[CrossRef\]](#)
21. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [\[CrossRef\]](#)
22. Fowler, B.; Burlina, A.; Kozich, V.; Vianey-Saban, C. Quality of analytical performance in inherited metabolic disorders: The role of ERNDIM. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2008**, *31*, 680–689. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Bravo-Alonso, I.; Navarrete, R.; Vega, A.I.; Ruiz-Sala, P.; Silva, M.T.G.; Martín-Hernández, E.; Quijada-Fraile, P.; Belanger-Quintana, A.; Stanescu, S.; Bueno, M.; et al. Genes and Variants Underlying Human Congenital Lactic Acidosis-From Genetics to Personalized Treatment. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1811. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Paredes-Fuentes, A.J.; Montero, R.; Codina, A.; Jou, C.; Fernández, G.; Maynou, J.; Santos-Ocaña, C.; Riera, J.; Navas, P.; Drobnic, F.; et al. Coenzyme Q 10 Treatment Monitoring in Different Human Biological Samples. *Antioxidants* **2020**, *9*, 979. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Molyneux, S.L.; Florkowski, C.M.; Lever, M.; George, P.M. Biological variation of coenzyme Q10. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 455–457. [\[CrossRef\]](#)
26. Miles, L.; Miles, M.V.; Tang, P.H.; Horn, P.S.; Wong, B.L.; DeGrauw, T.J.; Morehart, P.J.; Bove, K.E. Muscle coenzyme Q: A potential test for mitochondrial activity and redox status. *Pediatr. Neurol.* **2005**, *32*, 318–324. [\[CrossRef\]](#)

27. Duncan, A.J.; Bitner-Glindzicz, M.; Meunier, B.; Costello, H.; Hargreaves, I.P.; López, L.C.; Hirano, M.; Quinzii, C.M.; Sadowski, M.I.; Hardy, J.; et al. A Nonsense Mutation in COQ9 Causes Autosomal-Recessive Neonatal-Onset Primary Coenzyme Q10 Deficiency: A Potentially Treatable Form of Mitochondrial Disease. *Am. J. Hum. Genet.* **2009**, *84*, 558. [\[CrossRef\]](#)
28. Barca, E.; Musumeci, O.; Montagnese, F.; Marino, S.; Granata, F.; Nunnari, D.; Peverelli, L.; DiMauro, S.; Quinzii, C.M.; Toscano, A. Cerebellar ataxia and severe muscle CoQ10 deficiency in a patient with a novel mutation in ADCK3. *Clin. Genet.* **2016**, *90*, 156–160. [\[CrossRef\]](#)
29. Arias, A.; García-Villoria, J.; Rojo, A.; Buján, N.; Briones, P.; Ribes, A. Analysis of coenzyme Q10 in lymphocytes by HPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *908*, 23–26. [\[CrossRef\]](#)
30. Colomé, C.; Artuch, R.; Vilaseca, M.A.; Sierra, C.; Brandi, N.; Lambruschini, N.; Cambra, F.J.; Campistol, J. Lipophilic antioxidants in patients with phenylketonuria. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 185–188. [\[CrossRef\]](#)
31. Lee, B.L.; Ong, C.N. Comprehensive high-performance liquid chromatographic method for the measurements of lipophilic antioxidants in human plasma. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3131–3137. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Schou-Pedersen, A.M.V.; Schemeth, D.; Lykkesfeldt, J. Determination of Reduced and Oxidized Coenzyme Q 10 in Canine Plasma and Heart Tissue by HPLC-ECD: Comparison with LC-MS/MS Quantification. *Antioxidants* **2019**, *8*, 253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Zheng, J.; Bi, J.; Johnson, D.; Sun, Y.; Song, M.; Qiu, P.; Dong, P.; Decker, E.; Xiao, H. Analysis of 10 metabolites of poly-methoxyflavones with high sensitivity by electrochemical detection in high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 509–516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. García, M.C. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *825*, 111–123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Kotani, A.; Yuan, Y.; Yang, B.; Hayashi, Y.; Matsuda, R.; Kusu, F. Selection of the optimal solvent grade for the mobile phase in HPLC with electrochemical detection based on FUMI theory. *Anal. Sci. Int. J. Japan Soc. Anal. Chem.* **2009**, *25*, 925–929. [\[CrossRef\]](#)
36. Paredes-Fuentes, A.J.; Julià-Palacios, N.A.; Montero, R.; Yubero, D.; Cascajo-Almenara, M.V.; García-Cazorla, A.; Santos-Ocaña, C.; Artuch, R. Laboratory Diagnosis of a Case with Coenzyme Q10 Deficiency. *Clin. Chem.* **2020**, *66*, 1465–1467. [\[CrossRef\]](#)

Supplementary Material 1

Explanation Reports -Annual Report-



Annual Report : lay-out and underlying statistics

Explanation of the numbers

This report is made once a year and based on all data submitted during the annual cycle. Outliers (results exceeding the mean $\pm 7SD$) are removed before the calculations. The first column lists all analytes in the scheme. Column 2 deals with accuracy: you can see your mean outcome in that year in comparison to the mean of all labs. The third column deals with precision. From the four hidden duplicates the CV is calculated according to:

$$CV = \frac{\sqrt{\frac{\sum(\Delta)^2}{n}}}{\bar{x} \sqrt{2}} \times 100\%$$

CV = Coefficient of Variation

Δ = Difference in the duplicate

n = number of duplicates

$\bar{x}$ = mean of results

Again the lab's precision is compared with the median CV of other labs (precision of your lab and of all labs, respectively).

Column 4 deals with the linearity. For each laboratory the coefficient of regression r is calculated with the weighed amounts on the x-axis and the submitted results on the y-axis. The lab's r and the median r of all labs are listed.

Column 5 deals with the recovery. Linearity calculation in column 4 also revealed the relation $y = ax + b$ between submitted results (y) and weighed amounts (x). The slope a is multiplied with 100% and is the recovery of weighed amounts. Again recovery of the lab and the median recovery of all labs is encountered.

The last column shows general data of all labs: the number of labs who submitted results (n) and the Interlab CV calculated according to

$$InterlabCV = \frac{\sqrt{\frac{\sum SD^2}{n}}}{\bar{x}}$$

CV = Interlab CV in the respective specimens of the cycle

SD = standard deviation

n = number of specimens in a cycle

$\bar{x}$ = mean of results

The Interlab CV is an indication of the state of the art of harmonisation of results between labs and as such an indication how urgent efforts to achieve better standardisation are needed!

Flags Analytical Parameters

In the annual report (below) the four analytical parameters accuracy – precision – linearity – recovery are shown. Parameters that can not be calculated are marked with a flag:

- No results submitted: empty white box (example: Malic acid)
- Few Results (defined as <6 out of 8 results): **FR** in a white box (Mevalonic acid)
- Outlying Results (defined as 2 or more outliers): **OR** in a purple box (Glycolic acid)
- Outlying Results & Few Results (defined as <6 results from which at least one an outlier): **ORFR** in a yellow box (Ethylmalonic acid)
- Missing Pair (defined as the situation in which both results of a samplepair are missing or an outlier): **MP** in an amber box (Adipic acid)
- A red flags marks a result in the category "5% worst performances of all labs". Numeric result in a red box (Suberic acid).

 ERNDIMQA - ANNUAL REPORT Quant.org.acids										
Methodset : GC-MS										
Analyte	Accuracy (mean)		Precision (CV% duplicates)		Linearity (r)		Recovery (%added analyte)		Data All Labs	
	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	n	Interlab CV
2-OH Glutamic acid	MP	152	32.0%	20.8%	0.877	0.980	89%	93%	77	35.6%
3-methylglutamic acid	MP	70.4	26.3%	15.0%	0.914	0.985	117%	101%	77	23.6%
3-OH-3 methylglutamic acid	FR	66.9	FR	24.7%	FR	0.983	FR	77%	65	62.4%
3-OH-Isobutyric acid	OR	136	OR	20.4%	OR	0.979	OR	71%	53	37.0%
3-OH-Isovaleric acid	FR	78.1	FR	39.3%	FR	0.940	FR	112%	73	55.5%
4-OH-Butyric acid	FR	72.8	FR	31.2%	FR	0.982	FR	70%	63	56.7%
Adipic acid	MP	178	31.6%	12.6%	0.950	0.993	85%	101%	85	26.4%
Creatinine		3258		3.4%		0.000		0%	67	5.25%
D,L- Glyceric acid	FR	278	FR	22.0%	FR	0.985	FR	83%	64	47.0%
Ethylmalonic acid	ORFR	50.0	ORFR	17.1%	ORFR	0.992	ORFR	99%	89	36.3%
Fumaric acid	MP	60.0	19.5%	14.5%	0.991	0.991	75%	100%	78	28.5%
Glutaric acid	MP	112	44.0%	13.1%	0.994	0.994	86%	101%	90	21.8%
Glycolic acid	OR	236	OR	20.6%	OR	0.963	OR	89%	77	38.0%
Hexanoylglycine	MP	17.0	29.3%	29.9%	0.949	0.950	111%	100%	64	37.2%
Keto-glutaric acid		198		21.4%		0.992		103%	73	40.1%
Malic acid		117		19.8%		0.995		81%	53	47.4%
Methylmalonic acid	305	330	31.2%	11.4%	0.995	0.996	95%	102%	104	27.6%
Mevalonic acid	FR	132	FR	21.7%	FR	0.992	FR	82%	56	46.1%
Pyroglutamic acid	353	322	61.6%	23.0%	0.879	0.980	106%	85%	73	44.2%
Sebacic acid	MP	55.4	15.2%	19.4%	0.987	0.987	91%	101%	83	35.9%
Suberic acid	129	172	11.5%	16.3%	0.992	0.990	94%	105%	84	32.4%
Tiglylglycine	MP	83.6	17.0%	24.9%	0.975	0.987	54%	85%	57	48.0%
Vanillic acid		38.5		19.4%		0.975		98%	38	33.0%
Overall	260	270	29.0%	20.1%	0.944	0.940	88%	89%	71	37.7%

Flags Analytes

Acceptable performance of an analyte is marked with a green flag (analyte name in green box) and applies when at least 3 of the 4 analytical parameters show satisfying results:

- 4 satisfying parameters (no flags = approved): Methylmalonic acid
- 3 satisfying parameters (1 flag = approved): Tiglylglycine
- 2 satisfying parameters (2 flags = not approved): Suberic acid (2 red flags) and Glutaric acid (1 red and 1 amber flag).
- 1 satisfying parameter (3 flags = not approved): no example
- 0 satisfying parameters (4 flags = not approved): Glycolic acid

Poor Performance

The poor performance policy of ERNDIM is based on the number of flags for the analytical parameters in the annual report. The scientific advisor of the scheme sends a performance support letter to the laboratories with the highest number of flags.

Annual Report

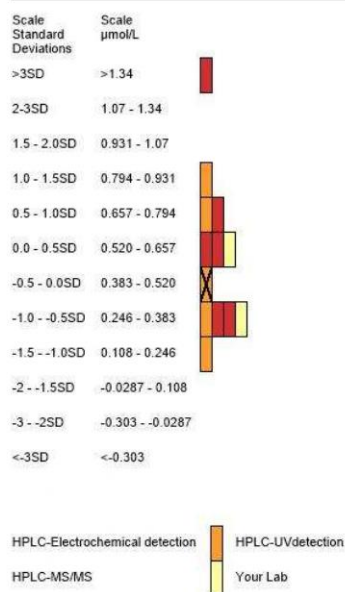
A comment to the annual report can be downloaded from the bottom of the report.

Supplementary Material 2


ERNDIMQA - ANALYTE IN DETAIL
Special assays serum 2021

Lab Name : ERN0049 - HOSPITAL SAN JOAN DE DEU - Servei de Bioquímica (Metabolopaties)
Method Set : HSJD
Sample : SAS2021.08
Analyte : Coenzyme Q10
Deadline : 29/10/2021
Unit : $\mu\text{mol/L}$
Your Method : HPLC-Electrochemical detection
Your Result : 0.510

Parameter	Method Results	All Labs Results
n :	5	13
Mean :	0.590	0.520
Median :	0.590	0.532
SD :	0.119	0.274



Supplementary Table S1. Accuracy assessed by laboratory intercomparison.

	Mean values detected ($\mu\text{mol/L}$)	
	2020	2021
All participants	0.757 ($n = 11$)	0.901 ($n = 13$)
New HPLC-ED method	0.860	1.34
% deviation	113.6	148.7

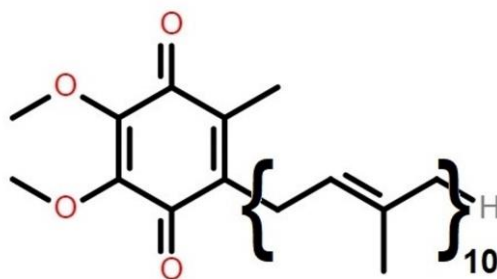


Figure S1. Chemical structure of coenzyme Q10

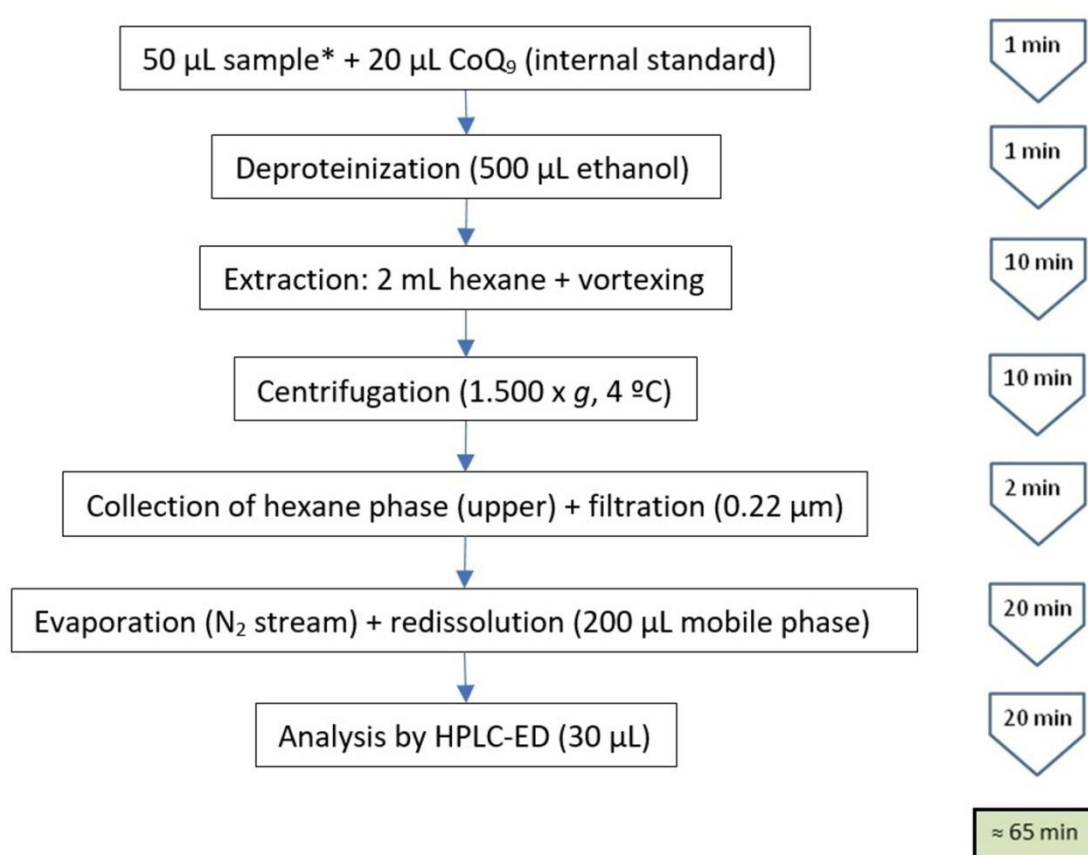


Figure S2. Flowchart of the general workflow for CoQ analysis in different biological samples, with marks on the timing required for a technician with HPLC skills.

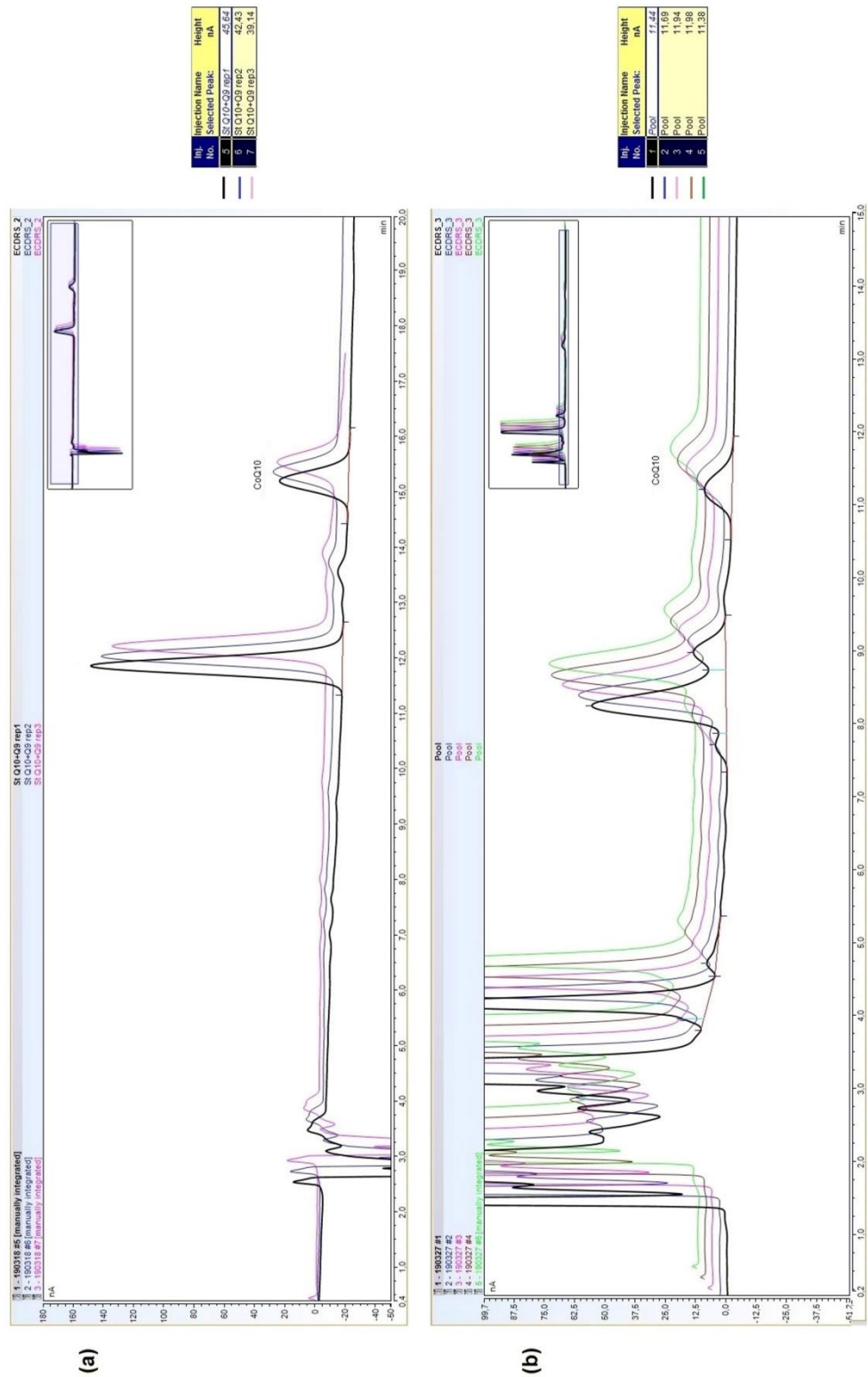


Figure S3. (a) Analysis of a calibrator solution before complete optimization of the method. In this case, a gradual loss in cell performance is observed, as indicated by the decreasing peak heights of CoQ. (b) Analysis of a pool of plasma samples with a further optimized method, which included an electrochemical treatment of cells after each run. In this case, cell performance was stable in time.

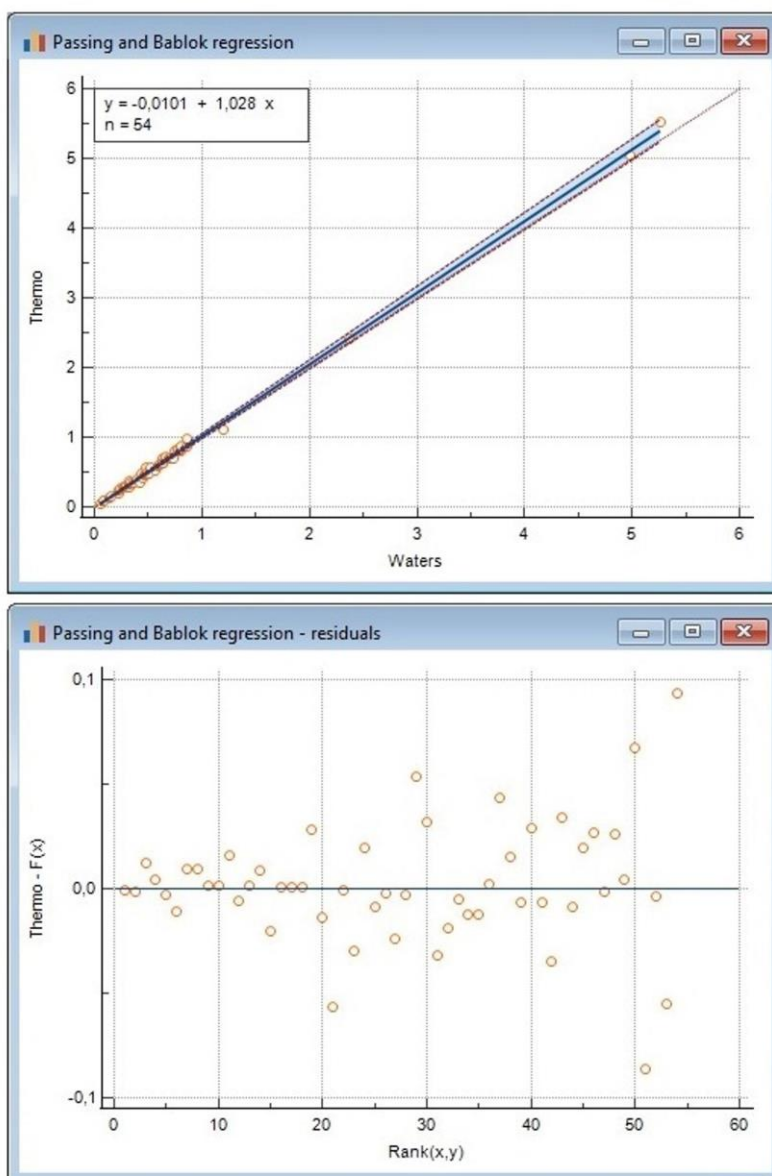


Figure S4. Passing-Bablok regression analysis of the two HPLC-ED methods: new ('Thermo') and old one used with the ESA Coulochem II ED ('Waters').

RESULTADOS

1. INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS

En este trabajo de tesis doctoral titulado ‘Estudio de biomarcadores en los defectos de la fosforilación oxidativa mitocondrial y en las deficiencias de coenzima CoQ₁₀’, el doctorando Abraham José Paredes Fuentes ha participado de forma fundamental en todos los trabajos publicados y detallo a continuación sus contribuciones en cada uno de los cuatro artículos que contiene. Ninguno de los artículos presentados en esta tesis ha sido presentado en otra defensa de tesis doctoral.

PUBLICACIÓN 1. *Circulating cell-free mitochondrial DNA in cerebrospinal fluid as a biomarker for mitochondrial diseases.* Selena Trifunov *, Abraham J. Paredes-Fuentes *, Carmen Badosa, Anna Codina, Julio Montoya, Eduardo Ruiz-Pesini, Cristina Jou, Glòria Garrabou, Josep M. Grau-Junyent, Dèlia Yubero, Raquel Montero, Jordi Muchart, Juan D. Ortigoza-Escobar, Maria M. O’Callaghan, Andrés Nascimento, Albert Català, Àngels Garcia-Cazorla, Cecilia Jimenez-Mallebrera, Rafael Artuch. **Clinical Chemistry** 2021 Aug 5;67(8):1113-1121. Factor de impacto (2021): 12.167 (D1).

En este trabajo el doctorando comparte coautoría de primer firmante. Su contribución fue fundamental ya que realizó la selección de las muestras, la recopilación de datos de los pacientes estudiados, el análisis del ADN mitocondrial libre circulante mediante PCR digital y participó en el análisis de resultados y en la redacción del manuscrito.

PUBLICACIÓN 2. *Coenzyme Q₁₀ treatment monitoring in different human biological samples.* Abraham J. Paredes-Fuentes, Raquel Montero, Anna Codina, Cristina Jou, Guerau Fernández, Joan Maynou, Carlos Santos-Ocaña, Joan Riera, Plácido Navas, Franchek Drobnic, Rafael Artuch. **Antioxidants (Basel)** 2020 Oct 13;9(10):979. Factor de impacto (2020): 6.313 (Q1).

En este trabajo el doctorando realizó gran parte del trabajo experimental (análisis de la coenzima Q₁₀ en diferentes muestras biológicas), analizó los datos y contribuyó a la redacción del manuscrito.

PUBLICACIÓN 3. *Laboratory diagnosis of a case with coenzyme Q₁₀ deficiency.* Abraham J. Paredes-Fuentes, Natalia A. Julià-Palacios, Raquel Montero, Dèlia Yubero, María V. Cascajo-Almenara, Àngels García-Cazorla, Carlos Santos-Ocaña, Rafael Artuch. **Clinical Chemistry** 2020 Nov 1;66(11):1465-1467. Factor de impacto (2020): 8.327 (D1).

En este trabajo el doctorando participó en el análisis de los biomarcadores de enfermedad mitocondrial estudiados (aminoácidos, ácidos orgánicos y FGF-21), determinó el contenido de coenzima Q₁₀ en diferentes especímenes biológicos y redactó el manuscrito.

PUBLICACIÓN 4. *Technical aspects of coenzyme Q₁₀ analysis: validation of a new HPLC-ED method.* Abraham J. Paredes-Fuentes, Clara Oliva, Raquel Montero, Patricia Alcaide, George J. G. Ruijter, Judit García-Villoria, Pedro Ruiz-Sala and Rafael Artuch. **Antioxidants (Basel) 2022 Mar 10; 11(3):528.** Factor de impacto (2021): 7.675 (Q1).

En mi opinión, este trabajo ha sido la consolidación del doctorando respecto a su capacidad de liderazgo futuro en publicaciones científicas, ya que ha sido él quien ha llevado el peso no sólo del trabajo experimental (desarrollo y validación del método HPLC con detección electroquímica para la determinación de la coenzima Q₁₀ en plasma y su aplicación a otras muestras biológicas, y participación en el programa de control externo de la calidad de ERNDIM), sino también de la redacción y del proceso de envío del artículo a la revista científica (es por ello que figura como autor de correspondencia).

Barcelona, a 16 de septiembre de 2022



Dr. Rafael Artuch Iriberry

2. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

Actualmente, uno de los retos en el ámbito de las EM consiste en la validación de nuevos biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes, dado que los que se utilizan rutinariamente en los laboratorios dedicados al estudio de estas enfermedades carecen de buena sensibilidad y especificidad. En el primer capítulo de esta tesis, nuestro objetivo fue investigar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y la investigación de EM causadas por defectos OXPHOS. El SNC es un órgano diana de las EM y difícilmente accesible en el que, por razones obvias, la biopsia queda descartada. Por ello, consideramos que la muestra de LCR puede ser utilizada en cierto modo como una biopsia líquida. Como resultado del primer trabajo publicamos un artículo en el que reportamos por primera vez el análisis del ccfmtDNA en muestras de LCR de pacientes mitocondriales (**Publicación 1**). En una cohorte de 25 pacientes con diagnóstico molecular definitivo de EM, demostramos que los niveles de ccfmtDNA en LCR eran aproximadamente seis veces superiores a los de un grupo de 20 controles pareados por edad. Además, dentro de la cohorte de pacientes, observamos diferencias en el valor medio del número de copias de ccfmtDNA, siendo aquéllos con síndromes de depleción y deleciones del mtDNA (MDD) causados por mutaciones en genes nucleares (*POLG*, *DNM1L*, *GFM1*) los que presentaban niveles más elevados de ccfmtDNA, seguidos por el grupo de pacientes MDD con deleciones únicas del mtDNA. El estudio de dos muestras del mismo paciente con síndrome de Pearson en dos etapas diferentes de su enfermedad nos permitió observar un incremento considerable en el número de copias de ccfmtDNA cuando la enfermedad manifestó el fenotipo neurológico, sugiriendo la posible utilidad de este nuevo biomarcador en el seguimiento de los pacientes mitocondriales. También demostramos la presencia de heteroplasmia en el ccfmtDNA de las muestras de LCR, al detectar tanto moléculas del fenotipo silvestre como moléculas que presentaban deleciones. Finalmente, en cuanto al estudio de otros biomarcadores de EM, observamos que los pacientes MDD con deleciones únicas del mtDNA presentaban concentraciones de la citoquina GDF-15 en LCR significativamente superiores a las del grupo control; además, encontramos una correlación positiva significativa entre niveles de ccfmtDNA y concentraciones de GDF-15. En conclusión, con los resultados de esta primera publicación demostramos la utilidad del análisis del ccfmtDNA en LCR como nuevo biomarcador para la investigación, el diagnóstico y, potencialmente, el seguimiento de pacientes con EM.

Como segundo objetivo nos propusimos analizar los valores de CoQ en diferentes muestras biológicas con fines diagnósticos y de monitorización del tratamiento. Por un lado, nos propusimos estudiar qué muestra biológica es la más adecuada para la monitorización del control del tratamiento con CoQ (**Publicación 2**). Como resultado, publicamos un artículo en el que analizamos las concentraciones de CoQ en un conjunto de muestras biológicas (plasma, células mononucleares o BMCs, plaquetas, orina y músculo) de 11 corredores sanos antes (grupo 1) y después (grupo 2) de la suplementación oral con CoQ de forma diaria durante un

mes. También comprobamos si las concentraciones de CoQ en músculo aumentaban tras la suplementación. Al comparar las concentraciones de CoQ en los grupos 1 y 2, no encontramos diferencias significativas en el contenido de CoQ en BMCs, plaquetas y orina. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de CoQ, expresadas en valores absolutos, sí aumentaron de forma significativa tras la suplementación. En el caso del músculo, el aumento se acercaba a la significación estadística. Aunque no observamos una correlación entre los valores de CoQ en plasma y músculo, cabe señalar que, tras la suplementación con CoQ, las concentraciones plasmáticas de CoQ aumentaron en todos los participantes, y las concentraciones en músculo aumentaron en la mayoría de ellos (8 de los 10 sujetos estudiados).

En cuanto a la **Publicación 3**, describimos el caso de un paciente con sospecha clínica de EM en el que los estudios bioquímicos, incluyendo el análisis de CoQ en distintas muestras biológicas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ED), fueron determinantes para su correcto diagnóstico. Por un lado, observamos una alteración de los biomarcadores rutinarios de EM (lactato en sangre venosa y LCR, alanina en plasma y LCR, ácidos orgánicos en orina), así como un aumento en la concentración de FGF-21 en plasma. El análisis de CoQ por HPLC-ED demostró que el paciente tenía concentraciones normales de CoQ en plasma, pero una disminución tanto en fibroblastos como en músculo. Además, la actividad enzimática de la succinato-citocromo *c* reductasa en fibroblastos, enzima dependiente del estado del CoQ mitocondrial, se encontraba disminuida. Finalmente, el análisis del exoma clínico nos llevó a la identificación de dos variantes con cambio de sentido en heterocigosis en el gen *COQ2*, lo que permitió clasificar el caso como una deficiencia primaria de CoQ.

Por último, y debido a que las celdas electroquímicas usadas con los detectores Coulochem han sido recientemente descatalogadas, en el tercer capítulo de esta tesis nos propusimos desarrollar y validar un procedimiento en un equipo con celdas nuevas y un diseño diferente, con el objetivo de analizar las concentraciones de CoQ en plasma de pacientes con sospecha de EM, y su posterior aplicación en otros especímenes biológicos para el diagnóstico de deficiencias de CoQ. Fruto de este trabajo publicamos un artículo en el que reportamos la validación de un nuevo método HPLC-ED para la determinación de CoQ en plasma que también puede emplearse para el análisis de otras muestras biológicas, como son músculo, orina y fibroblastos (**Publicación 4**). En este artículo detallamos los aspectos técnicos y la problemática encontrada durante el desarrollo del método, así como los resultados de los parámetros del estudio de validación, que resultaron ser adecuados tanto para el estudio de deficiencias de CoQ como para la monitorización del tratamiento con CoQ. Como parte de la validación del nuevo método, también reportamos nuestra experiencia de dos años como participantes en un programa piloto de control externo de la calidad de ERNDIM para la determinación de CoQ en plasma.

Presentamos la comparación de nuestros resultados con los de un método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) y los del resto de participantes, mediante la que pudimos comprobar que había una buena concordancia entre ambos métodos.

DISCUSIÓN

Uno de los factores responsables de la complejidad en el diagnóstico y la investigación en las EM es la falta de biomarcadores diagnósticos y pronósticos. La mayoría de los que se utilizan rutinariamente (lactato, piruvato, alanina, ácidos orgánicos en orina, acilcarnitinas) carecen de buena sensibilidad y especificidad [Gorman, 2016; Garg, 2017]. Aunque en los últimos años se ha reportado que las citoquinas GDF-15 y FGF-21 y la isoforma plasmática de la gelsolina pueden mejorar la especificidad diagnóstica de las EM [Suomalainen, 2011; Kalko, 2014; Peñas, 2021], lo cierto es que también puede encontrarse una alteración de las concentraciones de estos biomarcadores en otras patologías, incluso en enfermedades comunes como las cardiopatías, en las que el GDF-15 puede ser un buen biomarcador [Boenzi, 2018; Tsygankova, 2019; Lehtonen, 2021]. Los avances en las técnicas de NGS y el descubrimiento de nuevos genes responsables de las enfermedades genéticas han mejorado notablemente nuestra capacidad para diagnosticar las EM [Kremer, 2018; Stenton, 2020]. Sin embargo, muchos pacientes con sospecha de EM siguen sin diagnóstico molecular, debido en parte a las limitaciones técnicas de la NGS y a que se estima que todavía quedan por descubrir muchos genes responsables de la enfermedad [Parikh, 2019]. Además, hay que tener en cuenta que en los estudios genéticos pueden no identificarse mutaciones o encontrarse variantes cuya patogenicidad es incierta, y en ese sentido los estudios bioquímicos y funcionales siguen siendo de vital importancia para guiar en el diagnóstico y dar apoyo en la caracterización funcional de dichas variantes. Finalmente, cabe añadir que tampoco disponemos de buenos biomarcadores para la monitorización y predicción de la evolución de los pacientes, lo que supone otro desafío añadido para los clínicos responsables de su seguimiento.

De esta necesidad de disponer de buenos biomarcadores surge precisamente el objetivo principal de esta tesis, que no es otro sino el de progresar en el desarrollo de biomarcadores para el estudio de pacientes con EM. Las cuatro publicaciones recogidas en este trabajo contribuyen al avance en el campo de los biomarcadores de EM y de las deficiencias de CoQ, en tanto que: 1) hemos descrito un nuevo biomarcador en LCR para el diagnóstico y la investigación en EM, 2) hemos demostrado que la cuantificación de las concentraciones plasmáticas de CoQ son el mejor biomarcador subrogado para la monitorización del tratamiento oral con CoQ, 3) hemos reportado la importancia del análisis de diversos biomarcadores en el diagnóstico de las deficiencias de CoQ, y 4) hemos desarrollado y validado un nuevo método que permite detectar deficiencias de CoQ y monitorizar el tratamiento oral con CoQ.

1. Investigar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y la investigación de enfermedades mitocondriales causadas por defectos OXPHOS: análisis de ADN mitocondrial libre circulante en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedades mitocondriales.

Desde su descubrimiento hace más de dos décadas [Zhong, 2000], muchos autores se han interesado en estudiar la utilidad del ccfmtDNA como biomarcador, a pesar de que su origen y el mecanismo de su secreción a los fluidos biológicos siguen siendo objeto de debate. El ccfmtDNA se ha estudiado sobretodo en muestras de plasma, donde se han encontrado niveles aumentados en situaciones tales como necrosis, apoptosis, tumores e inflamación [Rahat, 2020]. Recientemente se ha publicado que, en una cohorte de pacientes con MELAS, los autores observaron un aumento de los niveles plasmáticos de ccfmtDNA asociado a eventos agudos o progresión de la neurodegeneración, sugiriendo así que dichos niveles podrían utilizarse para la monitorización del curso de la enfermedad [Maresca, 2020]. Respecto a LCR, hay pocos estudios publicados. Por un lado, se han reportado niveles de ccfmtDNA disminuidos en enfermedades neurodegenerativas (tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson) mientras que, por otro, se han encontrado niveles aumentados en enfermedades neuroinflamatorias (tales como la encefalitis por VIH y la encefalitis por anticuerpos contra el receptor de *N*-metil-*D*-aspartato o NMDA) [Gambardella, 2019].

Las enfermedades causadas por alteraciones en el mtDNA pueden clasificarse según estén asociadas a mutaciones puntuales, deleciones o depleción (reducción de los niveles de mtDNA por célula). Las deleciones pueden ser grandes y únicas, tal y como ocurre en los síndromes de Pearson y KSS [Pitceathly, 2012], o múltiples. En este último caso, se trata de fenotipos asociados a mutaciones en genes nucleares directamente relacionados con la replicación del mtDNA, las rutas de síntesis de nucleótidos o la síntesis de proteínas reguladoras de la dinámica mitocondrial [Viscomi, 2017]. Es conocido que en las EM, y en especial en los MDD, el mtDNA intracelular puede estar alterado tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, pero se desconocía qué influencia podía tener una alteración primaria mitocondrial en el ccfmtDNA del LCR de pacientes con EM. Por este motivo, en el primer trabajo de la presente tesis doctoral evaluamos por primera vez el estado del ccfmtDNA en LCR, junto a otros biomarcadores como el GDF-15, en una cohorte de pacientes con diagnóstico molecular de EM. Nuestros resultados demuestran que los niveles de ccfmtDNA en LCR de los pacientes mitocondriales son aproximadamente seis veces superiores a los que presentan los controles, por lo que dichos niveles podrían utilizarse como un nuevo biomarcador para mejorar el diagnóstico y la investigación en EM. Además, el número de copias de ccfmtDNA en LCR podría ser útil para facilitar la clasificación de los pacientes con EM, ya que comprobamos que los pacientes con MDD, tanto debidos a mutaciones en genes nucleares como a deleciones únicas del mtDNA,

eran los que presentaban los valores más elevados. Por otro lado, observamos incrementos moderados en los niveles de ccfmtDNA de aquellos pacientes con mutaciones puntuales en genes mitocondriales que codifican para ARNs de transferencia (tRNAs) y subunidades de la MRC, y también en aquéllos con mutaciones en genes nucleares relacionados con el metabolismo energético.

Esas diferencias observadas en los niveles de ccfmtDNA entre los distintos grupos de pacientes podrían explicarse mediante los diferentes mecanismos involucrados en la patogénesis de las EM. Por un lado, en los MDD causados por mutaciones en genes nucleares, el mantenimiento y la estabilidad del mtDNA están comprometidos. De forma similar, en pacientes MDD con deleciones únicas del mtDNA el defecto está presente ya en la embriogénesis y es responsable de la alteración de la integridad de las moléculas de mtDNA [Carelli, 2015]. Por el contrario, las mutaciones puntuales en genes nucleares estudiadas en nuestro trabajo afectan al metabolismo energético y pueden conducir a deficiencias de cofactores, de complejos de la MRC o de su ensamblaje. Las mutaciones puntuales en genes mitocondriales afectan principalmente a la generación de energía y pueden conducir a deficiencias aisladas o combinadas de complejos de la MRC o, en el caso de las mutaciones en genes que codifican para tRNAs, afectar a la síntesis mitocondrial de proteínas y alterar, de forma secundaria, la homeostasis mitocondrial [Boczonadi, 2014]. Sin embargo, las diferencias en los niveles de ccfmtDNA observadas entre los distintos grupos también podrían explicarse por los distintos niveles de heteroplasmia presentes en las células responsables de la secreción del LCR. Se conoce que las células epiteliales del plexo coroideo, responsables de la secreción de la mayoría del LCR, pueden presentar distintos porcentajes de heteroplasmia. De hecho, en pacientes KSS es característica la transformación oncocítica de estas células cuando presentan altos porcentajes de heteroplasmia [Tanji, 2000]. Sin embargo, desconocemos si esto también se produce en el síndrome de Pearson o en cualquier otro síndrome asociado con mutaciones en genes relacionados con el mantenimiento de la estabilidad del mtDNA.

Cabe mencionar que tuvimos la oportunidad de estudiar dos muestras de un mismo paciente con síndrome de Pearson y en la segunda, obtenida cuando la enfermedad manifestó el fenotipo neurológico (evolución a KSS), observamos un aumento considerable en los niveles de ccfmtDNA. Aunque es el único caso en el que pudimos disponer de dos muestras de un mismo paciente, y no podemos asegurar que el incremento en el número de copias de ccfmtDNA esté directamente relacionado con la progresión de los síntomas neurológicos y/o la disfunción de las células del plexo coroideo, consideramos que estos resultados merecen ser tenidos en cuenta en futuros estudios que incluyan un mayor número de casos. De confirmarse, nuestros resultados estarían en consonancia con los del estudio de Maresca y colaboradores [Maresca, 2020], y

reforzarían nuestra hipótesis de que los niveles de ccfmtDNA en LCR también podrían tener valor pronóstico y emplearse con fines de monitorización de la enfermedad.

La secreción del ccfmtDNA en enfermedades que afectan a la estabilidad del mtDNA intracelular sugiere que se trata de un proceso activo. Para interpretar este hecho proponemos diversas líneas de estudio a desarrollar. Por un lado, la proliferación mitocondrial como mecanismo compensatorio, como se observa en las fibras rojas-rasgadas de los pacientes con MDD [Trifunov, 2018], lo que sugeriría que el incremento adicional de mtDNA intracelular podría activar mecanismos de secreción del mtDNA fuera de la célula. La otra posibilidad sería que las células liberaran las mitocondrias disfuncionales. Incluso, otros mecanismos podrían explicar esas diferencias observadas en los niveles de ccfmtDNA entre los distintos grupos de pacientes, como el aumento del estrés oxidativo, la apoptosis o un aumento de mecanismos inflamatorios [Lu, 2014; Pan, 2018]. Dado que no se conoce con certeza el origen específico del ccfmtDNA a nivel celular y tisular, no podemos descartar que nuestros resultados representen simplemente un daño y recambio celular a nivel del SNC [Thurairajah, 2018]. Sin embargo, los resultados del estudio de la posible presencia de DNA nuclear libre circulante (los niveles obtenidos para el gen nuclear *BAX* eran inferiores en todos los casos a 1 copia/ μ L), la ausencia de correlación entre los niveles de ccfmtDNA y de *BAX* en la cohorte de pacientes mitocondriales, y la falta de asociación entre los niveles de ccfmtDNA y el daño del SNC evaluado por los estudios de imagen por resonancia magnética (MRI), sugieren que dicho recambio celular tendría una influencia muy limitada en nuestros resultados.

También hemos demostrado la existencia de heteroplasmia en el ccfmtDNA del LCR, ya que detectamos la presencia tanto de moléculas del fenotipo silvestre como delecionadas. Se trata de un hallazgo importante porque habitualmente la presencia de deleciones del mtDNA se suele evaluar en biopsia muscular ya que son difíciles de detectar en sangre, excepto en el caso del síndrome de Pearson. Aunque también pueden utilizarse muestras de orina, lo cierto es que el rendimiento de la extracción del ADN total en este tipo de muestra puede ser muy bajo. Deleciones del mtDNA de hasta un 10% son consideradas como debidas a la variabilidad natural [Lowes, 2019]. En nuestro estudio, cuatro de los controles estudiados presentaban deleciones de entre el 10 y el 20%, por lo que es posible que la variabilidad del ccfmtDNA en LCR sea mayor que para el mtDNA intracelular, y por ello este punto de corte deberá ser revisado en un futuro en una serie más grande de controles.

Entendemos las limitaciones que tiene el LCR como muestra biológica, siendo la principal de ellas que su obtención requiere de un procedimiento invasivo. Sin embargo, nuestra experiencia nos demuestra que en todos aquellos pacientes con síntomas neurológicos y sospecha de EM el LCR se recoge de forma rutinaria y permite detectar fenotipos metabólicos que pasan desapercibidos en sangre u orina. Además, el LCR es la única muestra biológica que

disponemos como espécimen subrogado para estudiar el estado del SNC, siendo en cierto modo como una biopsia líquida. Por todo ello, el análisis de un nuevo biomarcador como el ccfmtDNA en LCR puede ser de gran ayuda en el proceso diagnóstico y en la detección de enfermedades tratables como la deficiencia de folato cerebral observada en pacientes KSS, *POLG* y con otras EM [García-Cazorla, 2008].

Por otro lado, pudimos observar que las concentraciones de GDF-15 en LCR correlacionaban con los niveles de ccfmtDNA, y que eran particularmente elevadas en pacientes con MDD con deleciones únicas del mtDNA. Como ya hemos dicho, en pacientes KSS se ha reportado la transformación oncocítica de las células epiteliales del plexo coroideo y la acumulación de moléculas de mtDNA delecionadas en estas células [Tanji, 2000]. Al mismo tiempo, la estructura anatómica más importante en la síntesis de GDF-15 dentro del cerebro es el plexo coroideo, desde donde se secreta al LCR [Strelau, 2003]. Por tanto, la transformación oncocítica de dichas células podría explicar las concentraciones marcadamente elevadas de GDF-15 en pacientes con MDD con deleciones únicas.

Respecto a los estudios de MRI y los niveles de ccfmtDNA en LCR, los resultados deben interpretarse con cautela. Aunque todos los pacientes con alteraciones de la sustancia blanca presentaban niveles aumentados de ccfmtDNA, es cierto que todos ellos presentaban MDD que probablemente serían la causa primaria de dicho aumento. De hecho, hay enfermedades neurológicas, tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, en las que tiene lugar una pérdida neuronal significativa y se observan niveles de mtDNA comparables a los de los controles [Gambardella, 2019].

En definitiva, nuestros resultados indican que el estudio de los niveles de ccfmtDNA en LCR como biomarcador aporta una nueva herramienta para el diagnóstico y la investigación en EM, y podría ser también útil para evaluar la evolución clínica de los pacientes. En futuros estudios, cabe tener en cuenta que nuestro trabajo presenta diversas limitaciones, entre ellas el pequeño tamaño de la serie de casos estudiados, la heterogeneidad genética inherente a las EM y el hecho de que muchas de las muestras de LCR fueron recogidas cuando los pacientes se encontraban en tratamiento con cofactores y antioxidantes que podrían haber modificado los niveles de ccfmtDNA [Lowes, 2020].

2. Analizar la concentración de CoQ en diferentes muestras biológicas con fines diagnósticos y de monitorización del tratamiento: determinación de CoQ en plasma, músculo, fibroblastos, orina, plaquetas y células mononucleares.

El diagnóstico bioquímico de las deficiencias de CoQ permite instaurar de forma temprana el tratamiento con CoQ, y esto es de gran importancia ya que algunos pacientes responden bien al mismo [Desbats, 2015]. El análisis de las concentraciones de CoQ puede llevarse a cabo en distintos tipos de muestras biológicas, siendo el músculo, los fibroblastos y el plasma los especímenes biológicos más comunes para estudiar la deficiencia de CoQ. El músculo esquelético se ha considerado la muestra biológica de referencia durante muchos años, aunque tiene sus limitaciones, siendo la más importante que su obtención requiere de un procedimiento invasivo. Por el mismo motivo, no puede utilizarse con fines de monitorización del tratamiento. Los fibroblastos pueden obtenerse mediante un procedimiento menos invasivo y permiten llevar a cabo estudios funcionales. Sin embargo, también tienen limitaciones ya que, por ejemplo, se han reportado falsos negativos en pacientes con deficiencias de CoQ en músculo e incluso con deficiencias genéticas primarias [Barca, 2016]. La orina representa una muestra no invasiva y se ha propuesto que podría ser útil como biomarcador subrogado del estado de CoQ en el riñón, aunque esta correlación todavía no ha sido demostrada. El plasma tiene muchas ventajas ya que representa una muestra mínimamente invasiva, y se ha reportado que concentraciones plasmáticas bajas de CoQ pueden indicar con fiabilidad la existencia de una deficiencia secundaria de CoQ [Montero, 2019]. Sin embargo, los valores plasmáticos de CoQ pueden verse influenciados tanto por la dieta como por las concentraciones de lipoproteínas; por tanto, no se recomienda su uso para el diagnóstico de las deficiencias primarias de CoQ. Finalmente, el análisis de CoQ en linfocitos y plaquetas también puede ser útil en el diagnóstico de las deficiencias de CoQ si el paciente no ha recibido suplementación previa [Arias, 2012].

2.1. Monitorización del tratamiento con CoQ

Teniendo en cuenta el papel que juega la CoQ en muchos procesos biológicos que son considerados de vital importancia, el tratamiento con CoQ en aquellos pacientes que presentan una deficiencia es de gran importancia. La monitorización del tratamiento con CoQ es aconsejable tanto para el control del cumplimiento terapéutico como para modificar las dosis en aquellos casos en que pueda ser necesario. En el segundo trabajo de esta tesis doctoral, nos propusimos analizar la concentración de CoQ en diversas muestras biológicas para evaluar cuál de ellas es la más adecuada para utilizarla con fines de monitorización clínica en pacientes suplementados con CoQ. Además, también quisimos evaluar si la suplementación con CoQ en las condiciones de nuestro estudio (la dosis empleada en el mismo es ampliamente utilizada en

distintos suplementos alimenticios) aumentaba o no las concentraciones de CoQ en músculo esquelético. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio publicado en el que se analizan las concentraciones de CoQ tras suplementación en un abanico tan amplio de muestras biológicas.

En cuanto a las concentraciones de CoQ observadas en estado basal (grupo 1, previo a la suplementación) en las diferentes muestras, observamos que los resultados estaban en concordancia con nuestros propios valores de referencia y con aquéllos reportados por otros autores [Duncan, 2005; Molyneux, 2005; Montero, 2005; Niklowitz, 2007; Yubero, 2015; Montero, 2019]. Cuando comparamos los sujetos antes y después de la suplementación con CoQ, no observamos diferencias significativas en las concentraciones en BMCs, plaquetas y orina. En primer lugar, los datos publicados relativos a BMCs son controvertidos: mientras que Arias y colaboradores observaron que las concentraciones de CoQ en linfocitos no aumentaban significativamente tras la suplementación con 100 mg/día durante una semana [Arias, 2012], otros autores sí que han reportado un aumento en las concentraciones de CoQ en linfocitos tras la suplementación durante el mismo periodo de tiempo y con la misma dosis [Tomasetti, 2001]. A dosis mayores (200 mg/día), se ha observado un incremento en las concentraciones de CoQ en BMCs [Turunen, 2002]. Al igual que para las BMCs, se han reportado resultados controvertidos en cuanto a las plaquetas. Nosotros observamos un ligero aumento no significativo en los valores medios de CoQ en plaquetas tras la suplementación, aunque en 4 de los 11 sujetos no observamos dicho aumento. Niklowitz y colaboradores reportaron que la suplementación con CoQ aumentaba de forma significativa los niveles de CoQ en plaquetas tras 14 días de suplementación (3 mg/kg de peso/día), con un aumento posterior observado tras 28 días, aunque éste no era estadísticamente significativo [Niklowitz, 2007]. Miles y colaboradores reportaron resultados similares en las concentraciones totales de CoQ en plaquetas tras suplementación con 5 mg/kg de peso durante 28 días [Miles, 2008]. En cualquier caso, en estos estudios que acabamos de mencionar las dosis de CoQ relativas al peso corporal eran moderadamente superiores a las de nuestro trabajo. En cuanto a los resultados en orina, no hay estudios previos que hayan reportado el uso de las concentraciones de CoQ en orina para monitorización del tratamiento. La afectación del riñón en las EM y en las deficiencias de CoQ (**Tabla 2**) sugiere que este tipo de muestra no invasiva sería de gran utilidad para monitorización del tratamiento como biomarcador subrogado del estado del riñón. Cabe tener en cuenta que las dosis de CoQ empleadas en pacientes con EM son marcadamente mayores que las dosis usadas en nuestro estudio (pueden alcanzar los 30 mg/kg peso/día), siendo por tanto una de las limitaciones del mismo. En resumen, BMCs, plaquetas y orina no parecen ser adecuadas para la monitorización del tratamiento con CoQ, al menos en las condiciones de nuestro estudio. Una posible explicación para esto es que las concentraciones de CoQ en dichos especímenes biológicos probablemente tienen una gran variación biológica. Además, otros

factores también podrían explicar dichos resultados, especialmente si los comparamos con el análisis ‘directo, sin manipulación’ de las concentraciones de CoQ en plasma: el proceso laborioso que supone el aislamiento de las células de estos especímenes biológicos, el recambio rápido de BMCs y plaquetas, o la heterogeneidad celular en BMCs y orina, ya que los procedimientos de aislamiento de las células no son muy selectivos.

El plasma resultó ser la mejor muestra para la monitorización del tratamiento con CoQ, tanto analizando las concentraciones totales de CoQ como los valores relativos a colesterol, una molécula que está estrechamente relacionada con la biosíntesis del CoQ (**Figura 4**) [Montero, 2019]. En todos los participantes del estudio observamos un aumento significativo de sus valores plasmáticos de CoQ tras la suplementación. Este hecho ya ha sido reportado por otros autores [Turunen, 2002; Niklowitz, 2007; Cooke, 2008]. El principal problema en relación al plasma es que sólo refleja la absorción intestinal y el metabolismo hepático del CoQ suplementado, pero no la captación del CoQ por los tejidos, proceso que todavía sigue siendo poco conocido en humanos [Bentinger, 2003; Desbats, 2015]. Por este motivo, decidimos analizar en paralelo las concentraciones de CoQ en músculo y en plasma tras la suplementación oral con CoQ, para evaluar si aumentaban dichas concentraciones en músculo en las condiciones de nuestro estudio.

El músculo esquelético es un tejido postmitótico con alta demanda energética, rico en mitocondrias y CoQ, y uno de los principales órganos diana de la mayoría de EM. Por ello, conocer si la CoQ llega o no al músculo tras la suplementación oral es de gran importancia para el tratamiento de los pacientes con EM, otros errores congénitos del metabolismo y enfermedades neurogenéticas que conlleven a una deficiencia de CoQ. Aunque en nuestro estudio no observamos diferencias significativas en las concentraciones de CoQ en músculo antes y después de la suplementación, ni ninguna correlación entre las concentraciones plasmáticas y las de músculo, lo cierto es que la mayoría de los sujetos suplementados (8 de los 10) vieron incrementados sus concentraciones de CoQ en músculo. Además, los 2 únicos sujetos cuyas concentraciones de CoQ en músculo no incrementaron tras la suplementación eran el segundo y tercero en cuanto a peso corporal, es decir, tenían dos de las relaciones dosis/peso más bajas de toda la serie. Algunas posibles explicaciones para la falta de correlación entre las concentraciones de CoQ en músculo y plasma serían, por un lado, el tamaño limitado de nuestra serie y, por otro, el hecho de que los factores biológicos que modulan las concentraciones de CoQ en plasma y músculo son diferentes. En un estudio previo se reportó que la suplementación oral con CoQ (150 mg/día durante 4 semanas) no altera las concentraciones de CoQ en músculo de forma significativa, a pesar de la elevación significativa de los valores plasmáticos de CoQ [Zhou, 2005]. Cooke y colaboradores demostraron que la suplementación con una dosis única de CoQ (200 mg/día) tendía a incrementar las concentraciones de CoQ en músculo, aunque no

observaron cambios significativos tras un periodo de suplementación de 14 días [Cooke, 2008]. Teniendo en cuenta que las relaciones dosis/peso reportadas en artículos previos son similares a las de nuestro estudio, las diferencias observadas con nuestros resultados podrían deberse al uso de diferentes formulaciones y excipientes. De hecho, recientemente se han reportado diferencias considerables en la biodisponibilidad de diferentes formulaciones de CoQ monitorizadas en muestras de plasma [Pravst, 2020]. La formulación que empleamos en nuestro estudio (cápsulas de fitosoma) es una mezcla de fosfolípidos (lecitina) y CoQ, donde ésta se sitúa entre las moléculas de lecitina. Esta formulación ya ha demostrado ser segura e incrementar la absorción de la CoQ en humanos [Petrangolini, 2019]. En cualquier caso, nuestros resultados sugieren que probablemente empleando dosis mayores de CoQ todos los sujetos hubiesen mostrado un incremento en las concentraciones de CoQ en músculo.

En conclusión, la cuantificación de las concentraciones de CoQ en plasma parece ser el mejor biomarcador subrogado para la monitorización del tratamiento oral con CoQ, ya que los valores plasmáticos de CoQ aumentaron en todos los casos, en contraposición con las diferentes respuestas observadas con el resto de muestras biológicas.

2.2. Diagnóstico de un caso con deficiencia primaria de CoQ

En el segundo trabajo del capítulo 2 de la presente tesis doctoral demostramos la utilidad del análisis de las concentraciones de CoQ en diferentes muestras biológicas para el diagnóstico bioquímico de las deficiencias de CoQ. Describimos un paciente con una deficiencia primaria de CoQ que presentaba mutaciones en el gen *COQ2*. Este gen codifica para la 4-hidroxibenzoato polipreniltransferasa, un enzima que juega un rol fundamental en la biosíntesis de la CoQ ya que participa en la condensación del anillo de benzoquinona con la cadena lateral isoprenoide (**Figura 4**) [Forsgren, 2004; Salviati, 2017]. El inicio de la enfermedad suele ocurrir en la infancia, y las manifestaciones clínicas pueden incluir desde un SRNS aislado, un SRNS con encefalomiopatía, o una enfermedad neonatal multisistémica que puede llegar a ser mortal (**Tabla 2**). La afectación renal no se presenta siempre y puede desarrollarse sólo después de otras manifestaciones, como la miocardiopatía hipertrófica [Scalais, 2013]. En nuestro caso, el paciente presentó cianosis, letargia, disminución de los movimientos espontáneos, hiperexcitabilidad e hipotonía moderada durante las primeras 24 horas de vida. Dada la sospecha clínica de EM, se inició suplementación con diferentes cofactores mitocondriales (CoQ, tiamina, biotina y riboflavina), pero no se observó ninguna mejoría. A partir de entonces, el paciente desarrolló epilepsia refractaria, retraso psicomotor, nistagmus, y proteinuria en rango no nefrótico. Finalmente, el paciente falleció a los nueve meses de vida.

El análisis de un panel de 6.710 genes permitió la identificación de dos variantes con cambio de sentido en heterocigosis en el gen *COQ2* (NM_015697.7): c.692G>T (p.Ser231Ile) y c.443G>A (p.Gly148Asp), siendo el padre y la madre portadores de la primera y segunda variantes, respectivamente. La variante c.692G>T afecta a un residuo conservado entre especies, y se clasifica como VUS según las guías del *American College of Medical Genetics*. Esta variante aparece en *Genome Aggregation Database* (gnomAD) con una frecuencia alélica muy baja (0.00001627), y diferentes predictores de patogenicidad *in silico* indican que tiene un efecto deletéreo. La variante c.443G>A también se clasifica como VUS, no está presente en gnomAD, y los predictores de patogenicidad no indican una relación consistente. Globalmente, la frecuencia alélica tan baja de la primera variante, los resultados de los estudios de segregación y la demostración bioquímica de la deficiencia de CoQ apoyan la patogenicidad de ambas variantes.

Respecto a los estudios bioquímicos, cabe destacar que observamos una alteración de diversos biomarcadores de EM (elevación de lactato en sangre venosa y LCR, de alanina en plasma y LCR, de la excreción de ácidos orgánicos en orina relacionados con el metabolismo mitocondrial, y de FGF-21 en plasma). Aunque se considera que los biomarcadores rutinarios de EM carecen de buena sensibilidad y especificidad, en este caso permitieron confirmar la sospecha clínica de EM. Además, el análisis de CoQ por HPLC-ED jugó un papel determinante en la confirmación del diagnóstico de deficiencia primaria de CoQ, ya que permitió demostrar que el paciente tenía una disminución considerable de las concentraciones de CoQ tanto en fibroblastos como en músculo. Finalmente, este caso también pone de manifiesto que es recomendable analizar las concentraciones de CoQ en diferentes muestras biológicas, ya que la deficiencia puede no detectarse si no se escoge el espécimen adecuado [Desbats, 2015]. Nuestro paciente presentaba una concentración de CoQ en plasma normal, y fueron los análisis de CoQ en fibroblastos y músculo los que permitieron confirmar la deficiencia de CoQ.

3. Desarrollar y validar un nuevo procedimiento para analizar las concentraciones de CoQ en plasma de pacientes con sospecha de enfermedad mitocondrial, para su posterior aplicación en otros especímenes biológicos para el diagnóstico de deficiencias de CoQ.

El procedimiento de referencia para la identificación bioquímica de las deficiencias de CoQ consiste en la cuantificación de las concentraciones de CoQ mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los dos sistemas de detección que se utilizan mayoritariamente consisten en la detección UV y electroquímica. Los primeros métodos publicados utilizaban la detección UV, con los que habitualmente se cuantificaba la CoQ a 275 nm [Abe, 1978; Ogasahara, 1989]. Dado que el ubiquinol, forma reducida de la CoQ, no puede determinarse mediante detección UV debido a su baja absorptividad molar, diversos autores desarrollaron métodos basados en la detección electroquímica [Okamoto, 1988; Grossi, 1992], empleando tanto detectores coulométricos como amperométricos [Barshop, 2007; Lai, 2013]. Asimismo, se han publicado métodos basados en LC-MS/MS, con resultados comparables a los de los métodos HPLC-ED en cuanto a selectividad y sensibilidad [Hansen, 2004; Ruiz-Jiménez, 2007]. Finalmente, también se han desarrollado algunos procedimientos basados en técnicas de fluorescencia y quimioluminiscencia [Turkowicz, 2013; Kishikawa, 2014].

La HPLC-ED tiene ventajas significativas porque es más sensible que la HPLC-UV. De esta forma, permite trabajar con cantidades mínimas de muestra y obtener mayor precisión en los resultados. Además, es posible la detección simultánea de las dos formas de la CoQ (ubiquinol y ubiquinona, formas reducida y oxidada, respectivamente) (**Figura 3**) [Rodríguez-Aguilera, 2017]. Los procedimientos de medida basados en la HPLC-ED son tanto sensibles como selectivos, siendo por ello una herramienta ideal para analizar concentraciones bajas de moléculas en matrices complejas. Mediante la selección específica de potenciales de trabajo se puede detectar selectivamente un compuesto en una mezcla multicomponente. La técnica se fundamenta en la naturaleza electroactiva de moléculas que pueden ser oxidadas o reducidas, y permite el análisis de una gran variedad de compuestos biológicos y farmacéuticos. Nuestro grupo de investigación publicó un procedimiento para el análisis de CoQ en suero mediante HPLC-ED hace casi dos décadas [Colomé, 2003]. Desde entonces, hemos reportado la determinación de CoQ en otras muestras biológicas, incluyendo músculo, fibroblastos y orina [Montero, 2008; Yubero, 2015]. Todos estos métodos estaban basados en el uso del detector electroquímico ESA Coulochem II, que durante muchos años ha sido empleado en laboratorios de todo el mundo con distintos fines, incluyendo la determinación de CoQ. Sin embargo, hace poco se han descatalogado las celdas electroquímicas que emplea dicho detector y, por tanto, ya no está disponible en muchos laboratorios. Por este motivo nos vimos en la necesidad de

desarrollar un método para el análisis de CoQ en un equipo que utiliza unas celdas electroquímicas nuevas y técnicamente diferentes.

Todos los procedimientos para la determinación de CoQ reportados previamente por nuestro grupo y por otros autores hacían uso de una fase móvil que contenía perclorato de litio, que es una sal con propiedades oxidantes fuertes. Nuestra hipótesis es que la caída de señal tan abrupta que observamos con el uso de dicha sal y las nuevas celdas durante la optimización del nuevo método pudo deberse al daño químico de los electrodos por este compuesto, como ya sugirieron Lee y colaboradores [Lee, 2009]. Un estudio reciente ha reportado el uso de estas nuevas celdas con una fase móvil que contenía perclorato de litio, pero aplicado al análisis de CoQ en una serie pequeña de muestras [Schou-Pedersen, 2019]. Nuestra experiencia nos indica que es muy probable que dicho método no sea aplicable en el ámbito clínico para el análisis de CoQ en diferentes muestras biológicas y en grandes series de muestras. El acetato amónico es una sal utilizada rutinariamente en muchos laboratorios para distintos métodos de HPLC-ED y de espectrometría de masas (MS) [García, 2005; Zheng, 2015]. Su uso en la fase móvil, en lugar del perclorato de litio, fue esencial para optimizar el nuevo método de determinación de CoQ. Es conocido que el uso de solventes y compuestos de alta pureza en la fase móvil es crucial para minimizar la contaminación del detector electroquímico [Kotani, 2009]. En nuestro caso, fue necesario utilizar solventes de grado electroquímico previamente filtrados y acetato amónico de la mayor pureza disponible para lograr la optimización del método y evitar la pérdida de respuesta gradual de la celda electroquímica. La presencia de trazas de impurezas electroactivas puede aumentar de forma significativa el ruido de fondo y dañar permanentemente el electrodo de trabajo de la celda electroquímica. Por tanto, es muy importante que tanto solventes como muestras sean filtrados antes de su uso, y colocar un filtro antes de la entrada a las celdas. En nuestro caso, utilizamos dos filtros de grafito, uno antes y otro después del inyector.

La nueva celda electroquímica 6011RS contiene dos electrodos de trabajo que proporcionan el área de superficie necesaria para que tenga lugar la reacción electroquímica (**Figura 8**). En este modelo de celda, las superficies de los electrodos son más pequeñas que las de las celdas que se utilizaban con el detector ESA Coulochem II. Pensamos que esto conlleva a que su vida media sea más corta, es decir, que con la celda 6011RS los períodos de trabajo antes de que se observe una pérdida de respuesta son más cortos. En el nuevo método que hemos desarrollado, los componentes son reducidos en el primer electrodo y después oxidados y detectados en el segundo. Esta inversión del potencial se utiliza para mejorar la selectividad, ya que de esta manera muchos de los interferentes habituales son eliminados o sus concentraciones se ven reducidas significativamente [Honeychurch, 2016]. Sin embargo, también es recomendable utilizar una celda preanalítica o *guard cell* ya que, debido a su diseño, ésta permite eliminar muchos compuestos electroactivos indeseados y así evitar su llegada y posterior detección en la

celda analítica. En nuestro caso, para poder mantener un buen rendimiento de la celda analítica en el tiempo fue necesario utilizar una celda preanalítica (modelo 6020RS) y establecer una limpieza electroquímica de ambas celdas tras cada análisis. Aunque el nuevo procedimiento que hemos desarrollado es más rápido que los métodos previamente reportados por nuestro grupo (la duración total es de 10 minutos para todos los especímenes biológicos), la necesidad de implementar dicha limpieza electroquímica tras cada análisis hizo que finalmente la duración total sea equivalente a la de los métodos previos (20 minutos).

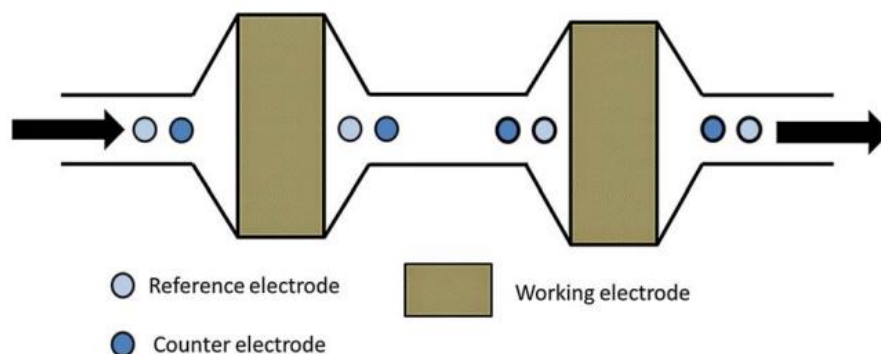


Figura 8. Sección transversal de la celda electroquímica 6011RS, donde se observan los dos electrodos de trabajo. Adaptada de [Maio, 2022].

La validación analítica del nuevo método se llevó a cabo mediante el cálculo de diferentes propiedades metrológicas, que permitieron constatar un rendimiento analítico adecuado para el ámbito del laboratorio clínico. Además, el método fue acreditado por la agencia ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) de acuerdo a la norma UNE-EN ISO 15189 para laboratorios clínicos, la cual supone uno de los máximos niveles de calidad analítica para los laboratorios clínicos. Los coeficientes de variación obtenidos, inferiores al 10%, son apropiados para el análisis de las concentraciones de CoQ en el ámbito clínico. El intervalo de medida del método (0.12-5.6 $\mu\text{mol/L}$) cubre un amplio rango de concentraciones de CoQ, incluyendo deficiencias graves y concentraciones elevadas debidas a la suplementación oral con CoQ. Respecto a los límites de decisión clínica, no hay un consenso general. Podemos considerar que el valor más bajo del intervalo de referencia (alrededor de 0.4 $\mu\text{mol/L}$) es el límite para detectar una deficiencia plasmática de CoQ, y éste se encuentra dentro del intervalo de medida del nuevo método. En cuanto a las concentraciones elevadas de CoQ, no hay un límite de decisión clínica claro dado que estos valores sólo se observan en pacientes bajo suplementación con CoQ, e igualmente no hay un consenso sobre qué valores plasmáticos de CoQ son los adecuados para la monitorización del tratamiento.

En relación a los resultados del nuevo programa de control externo de la calidad de ERNDIM para la determinación de CoQ en plasma de los años 2020 y 2021, podemos concluir que, globalmente, no fueron buenos. Mientras que los resultados individuales de todos los participantes fueron generalmente consistentes y presentaban una cierta concordancia, el rendimiento global evaluado al final de cada año demostró que algunos de los parámetros eran mejorables. La explicación más probable es que el programa ha comenzado recientemente y que han participado pocos laboratorios. Mientras que para algunos programas de ERNDIM participan más de 200 laboratorios, en el caso de la determinación de CoQ en plasma sólo se registraron 11 y 13 participantes en 2020 y 2021, respectivamente. Además, se reportaron tres metodologías distintas (HPLC-ED, HPLC-UV y LC-MS/MS), lo que es muy probable que este hecho contribuyera a aumentar la variabilidad de resultados entre laboratorios. Teniendo en cuenta que, en los últimos años, los métodos basados en la MS se han convertido en los más utilizados para el estudio de biomarcadores relacionados con los ECM, nos propusimos comparar nuestros resultados con aquéllos reportados por el laboratorio 2, que utilizó un método LC-MS/MS para la determinación de CoQ. Aunque sus resultados eran ligeramente superiores en muchos casos, la concordancia entre ambos métodos fue buena. Dado que en el año 2021 únicamente dos participantes reportaron el uso de un método LC-MS/MS, es difícil poder llegar a una conclusión respecto a ambas metodologías. Otros aspectos que cabría estudiar con más detalle en un futuro son la inestabilidad de la CoQ en la matriz liofilizada, que podría explicar la baja recuperación obtenida globalmente, o la presencia de interferencias que pueden afectar principalmente a los métodos HPLC-UV y HPLC-ED. En cualquier caso, una de las propiedades metrológicas más importantes, que es el coeficiente de variación interlaboratorio, disminuyó considerablemente del año 2020 al 2021. A pesar de esta mejoría, es necesaria la participación de más laboratorios para poder determinar con certeza la calidad y utilidad de este nuevo programa de control externo de la calidad de ERNDIM.

Finalmente, una de las limitaciones de este último trabajo de la presente tesis doctoral incluye el hecho de que la validación del método se llevó a cabo para muestras de plasma. Aunque es cierto que evaluamos el rendimiento del nuevo método empleando diferentes muestras biológicas, incluyendo todos aquellos especímenes utilizados habitualmente para el diagnóstico de las deficiencias de CoQ, el estudio de validación se llevó a cabo únicamente en plasma debido a la dificultad de poder disponer de grandes series de muestras de músculo y fibroblastos. Otros aspectos que cabría evaluar en futuros estudios incluyen la baja solubilidad y estabilidad de la CoQ, y el uso de matrices adecuadas para calibradores y controles.

En definitiva, este método ha demostrado ser útil para el análisis de CoQ en plasma, incluyendo la monitorización del tratamiento oral con CoQ, pero también para detectar deficiencias de CoQ como la reportada en la Publicación 3 de esta tesis doctoral.

CONCLUSIONES

1. Los niveles de ccfmtDNA en LCR de los pacientes mitocondriales son significativamente superiores a los que presentan los controles. Además, hemos demostrado la presencia de heteroplasmia en el ccfmtDNA de las muestras de LCR, al detectar tanto moléculas del fenotipo silvestre como moléculas que presentan deleciones. Estos resultados indican que el análisis del ccfmtDNA en LCR puede utilizarse como nuevo biomarcador para el diagnóstico y la investigación en EM.
2. El incremento en el número de copias de ccfmtDNA en LCR de un mismo paciente en dos etapas diferentes de su enfermedad sugiere que este nuevo biomarcador también podría tener valor pronóstico y emplearse con fines de monitorización de la enfermedad.
3. La cuantificación de las concentraciones de CoQ en plasma parece ser el mejor biomarcador subrogado para la monitorización del tratamiento oral con CoQ, ya que los valores plasmáticos de CoQ aumentaron en todos los casos, en contraposición con las diferentes respuestas observadas con el resto de muestras biológicas analizadas (BMCs, plaquetas y orina).
4. Aunque no observamos una correlación entre los valores de CoQ en plasma y músculo, cabe señalar que, tras la suplementación con CoQ, las concentraciones en músculo aumentaron en la mayoría de los sujetos estudiados. Nuestros resultados sugieren que probablemente empleando dosis mayores de CoQ todos los sujetos hubiesen mostrado un incremento en las concentraciones de CoQ en músculo.
5. El análisis de CoQ por HPLC-ED permitió la confirmación del diagnóstico de un paciente con deficiencia de CoQ, ya que demostramos que tenía una disminución considerable de las concentraciones de CoQ tanto en fibroblastos como en músculo. Este caso pone de manifiesto que es recomendable analizar las concentraciones de CoQ en diferentes muestras biológicas, ya que la deficiencia puede no detectarse si no se escoge el espécimen adecuado.
6. Hemos validado un nuevo método HPLC-ED que ha demostrado ser útil para el análisis de CoQ en plasma, incluyendo la monitorización del tratamiento oral con CoQ, pero también para detectar deficiencias de CoQ. Este nuevo procedimiento también puede utilizarse para el análisis de otras muestras biológicas, como son músculo, orina y fibroblastos.
7. Hemos evaluado un programa piloto de control externo de la calidad de ERNDIM para la determinación de CoQ en plasma. Los resultados indican una cierta mejoría en el segundo año, pero es necesaria la participación de más laboratorios para poder determinar con certeza la calidad y utilidad de este nuevo programa.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abe K, Ishibashi K, Ohmae M, Kawabe K, Katsui G. Determination of ubiquinone in serum and liver by high-speed liquid chromatography. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1978;24(6):555–67. doi: 10.3177/jnsv.24.555

Acosta MJ, Vazquez Fonseca L, Desbats MA, Cerqua C, Zordan R, Trevisson E, et al. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1857(8):1079–85. doi: 10.1016/j.bbabo.2016.03.036

Acosta MJ, Trevisson E, Canton M, Vazquez-Fonseca L, Morbidoni V, Baschiera E, et al. Vanillic Acid Restores Coenzyme Q Biosynthesis and ATP Production in Human Cells Lacking COQ6. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3904905. doi: 10.1155/2019/3904905

Alcázar-Fabra M, Trevisson E, Brea-Calvo G. Clinical syndromes associated with coenzyme Q10 deficiency. *Essays Biochem*. 2018;62(3):377–98. doi: 10.1042/EBC20170107

Arias A, García-Villoria J, Rojo A, Buján N, Briones P, Ribes A. Analysis of coenzyme Q10 in lymphocytes by HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2012;908:23–6. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.09.027

Awad AM, Bradley MC, Fernández-del-Río L, Nag A, Tsui HS, Clarke CF. Coenzyme Q10 deficiencies: pathways in yeast and humans. *Essays Biochem*. 2018;62(3):361–76. doi: 10.1042/EBC20170106

B

Barca E, Musumeci O, Montagnese F, Marino S, Granata F, Nunnari D, et al. Cerebellar ataxia and severe muscle CoQ10 deficiency in a patient with a novel mutation in ADCK3. *Clin Genet*. 2016;90(2):156–60. doi: 10.1111/cge.12742

Barshop BA, Gangoiti JA. Analysis of coenzyme Q in human blood and tissues. *Mitochondrion*. 2007;7 Suppl:S89-93. doi: 10.1016/j.mito.2007.04.002

Bentinger M, Dallner G, Chojnacki T, Swiezewska E. Distribution and breakdown of labeled coenzyme Q10 in rat. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(5):563–75. doi: 10.1016/s0891-5849(02)01357-6

Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*. 2007;7(Suppl.):S41-50. doi: 10.1016/j.mito.2007.02.006

Boczonadi V, Horvath R. Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;48(1):77–84. doi: 10.1016/j.biocel.2013.12.011

Boenzi S, Diodato D. Biomarkers for mitochondrial energy metabolism diseases. *Essays Biochem*. 2018;62(3):443–54. doi: 10.1042/EBC20170111

C

Camp KM, Krotoski D, Parisi MA, Gwinn KA, Cohen BH, Cox CS, et al. Nutritional interventions in primary mitochondrial disorders: developing an evidence base. *Mol Genet Metab*. 2016;119(3):187–206. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.09.002

Carelli V, Maresca A, Caporali L, Trifunov S, Zanna C, Rugolo M. Mitochondria: biogenesis and mitophagy balance in segregation and clonal expansion of mitochondrial DNA mutations. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;63:21–4. doi: 10.1016/j.biocel.2015.01.023

Colomé C, Artuch R, Vilaseca MA, Sierra C, Brandi N, Lambruschini N, et al. Lipophilic antioxidants in patients with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(1):185–8. doi: 10.1093/ajcn/77.1.185

Cooke M, Iosia M, Buford T, Shelmadine B, Hudson G, Kerksick C, et al. Effects of acute and 14-day coenzyme Q10 supplementation on exercise performance in both trained and untrained individuals. *J Int Soc Sports Nutr*. 2008;5. doi: 10.1186/1550-2783-5-8

Couce ML, Aldámiz-Echevarría L, García-Jiménez MC, González-Lamuño D. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades metabólicas hereditarias. 5ª ed. Ergon; 2022.

D

Davis RE, Williams M. Mitochondrial function and dysfunction: An update. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;342(3):598–607. doi: 10.1124/jpet.112.192104

Desbats MA, Lunardi G, Doimo M, Trevisson E, Salviati L. Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ10) deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(1):145–56. doi: 10.1007/s10545-014-9749-9

Doimo M, Desbats MA, Cerqua C, Cassina M, Trevisson E, Salviati L. Genetics of coenzyme Q10 deficiency. *Mol Syndromol*. 2014;5(3–4):156–62. doi: 10.1159/000362826

Duncan AJ, Heales SJR, Mills K, Eaton S, Land JM, Hargreaves IP. Determination of coenzyme Q10 status in blood mononuclear cells, skeletal muscle, and plasma by HPLC with di-propoxy-coenzyme Q10 as an internal standard. *Clin Chem*. 2005;51(12):2380–2. doi: 10.1373/clinchem.2005.054643

E

Emmanuele V, López LC, Berardo A, Naini A, Tadesse S, Wen B, et al. Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review. *Arch Neurol*. 2012;69(8):978–83. doi: 10.1001/archneurol.2012.206

F

Forsgren M, Attersand A, Lake S, Grünler J, Swiezewska E, Dallner G, et al. Isolation and functional expression of human COQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *Biochem J*. 2004;382(2):519–26. doi: 10.1042/BJ20040261

Frazier AE, Thorburn DR, Compton AG. Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *J Biol Chem.* 2019;294(14):5386–95. doi: 10.1074/jbc.R117.809194

G

Gambardella S, Limanaqi F, Ferese R, Biagioni F, Campopiano R, Centonze D, et al. ccf-mtDNA as a potential link between the brain and immune system in neuro-immunological disorders. *Front Immunol.* 2019;10:1064. doi: 10.3389/fimmu.2019.01064

García MC. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2005;825(2):111–23. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.03.041

García-Cazorla A, Quadros E V., Nascimento A, García-Silva MT, Briones P, Montoya J, et al. Mitochondrial diseases associated with cerebral folate deficiency. *Neurology.* 2008;70(16):1360–2. doi: 10.1212/01.wnl.0000309223.98616.e4

Garg U, Smith LD. Biomarkers in inborn errors of metabolism: clinical aspects and laboratory determination. 1st ed. Elsevier; 2017.

Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2:1–22. doi: 10.1038/nrdp.2016.80

Grossi G, Bargossi AM, Fiorella PL, Piazzzi S, Battino M, Bianchi GP. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of coenzyme Q10 in plasma. *J Chromatogr.* 1992;593(1–2):217–26. doi: 10.1016/0021-9673(92)80289-7

H

Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, et al. Mitochondrial disease: a practical approach for primary care physicians. *Pediatrics*. 2007;120(6):1326–33. doi: 10.1542/peds.2007-0391

Hansen G, Christensen P, Tüchsen E, Lund T. Sensitive and selective analysis of coenzyme Q10 in human serum by negative APCI LC-MS. *Analyst*. 2004;129(1):45–50. doi: 10.1039/b308690a

Hargreaves IP. Coenzyme Q10 as a therapy for mitochondrial disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;49(1):105–11. doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.020

Hirano M, Garone C, Quinzii CM. CoQ10 deficiencies and MNGIE: two treatable mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2012;1820(5):625–31. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.01.006

Honeychurch K. Review: The Application of Liquid Chromatography Electrochemical Detection for the Determination of Drugs of Abuse. *Separations*. 2016;3(4):28. doi: 10.3390/separations3040028

Hughes BG, Harrison PM, Hekimi S. Estimating the occurrence of primary ubiquinone deficiency by analysis of large-scale sequencing data. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi: 10.1038/s41598-017-17564-y

K

Kalko SG, Paco S, Jou C, Rodríguez MA, Meznaric M, Rogac M, et al. Transcriptomic profiling of TK2 deficient human skeletal muscle suggests a role for the p53 signalling pathway and identifies growth and differentiation factor-15 as a potential novel biomarker for mitochondrial myopathies. *BMC Genomics*. 2014;15(1). doi: 10.1186/1471-2164-15-91

Kishikawa N, Kuroda N. Analytical techniques for the determination of biologically active quinones in biological and environmental samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;87:261–70. doi: 10.1016/j.jpba.2013.05.035

Kisler JE, Whittaker RG, McFarland R. Mitochondrial diseases in childhood: a clinical approach to investigation and management. *Dev Med Child Neurol.* 2010;52(5):422–33. doi: 10.1111/j.1469-8749.2009.03605.x

Koene S, van Bon L, Bertini E, Jimenez-Moreno C, van der Giessen L, de Groot I, et al. Outcome measures for children with mitochondrial disease: consensus recommendations for future studies from a Delphi-based international workshop. *J Inherit Metab Dis.* 2018;41(6):1267–73. doi: 10.1007/s10545-018-0229-5

Kompare M, Rizzo WB. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Semin Pediatr Neurol.* 2008;15(3):140–9. doi: 10.1016/j.spen.2008.05.008

Kotani A, Yuan Y, Yang B, Hayashi Y, Matsuda R, Kusu F. Selection of the optimal solvent grade for the mobile phase in HPLC with electrochemical detection based on FUMI theory. *Anal Sci Int J Japan Soc Anal Chem.* 2009;25(7):925–9. doi: 10.2116/analsci.25.925

Kremer LS, Wortmann SB, Prokisch H. “Transcriptomics”: molecular diagnosis of inborn errors of metabolism via RNA-sequencing. *J Inherit Metab Dis.* 2018;41(3):525–32. doi: 10.1007/s10545-017-0133-4

L

Lai JF, Franke AA. Analysis of circulating lipid-phase micronutrients in humans by HPLC: review and overview of new developments. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2013;931:23–41. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.04.031

Lake NJ, Compton AG, Rahman S, Thorburn DR. Leigh syndrome: one disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann Neurol.* 2016;79(2):190–203. doi: 10.1002/ana.24551

Laredj LN, Licitra F, Puccio HM. The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimie*. 2014;100(1):78–87. doi: 10.1016/j.biochi.2013.12.006

Lee BL, Ong CN. Comprehensive high-performance liquid chromatographic method for the measurements of lipophilic antioxidants in human plasma. *J Chromatogr A*. 2009;1216(15):3131–7. doi: 10.1016/j.chroma.2009.01.101

Lehtonen JM, Auranen M, Darin N, Sofou K, Bindoff L, Hikmat O, et al. Diagnostic value of serum biomarkers FGF21 and GDF15 compared to muscle sample in mitochondrial disease. *J Inherit Metab Dis*. 2021;44(2):469–80. doi: 10.1002/jimd.12307

López LC, Schuelke M, Quinzii CM, Kanki T, Rodenburg RJT, Naini A, et al. Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet*. 2006;79(6):1125–9. doi: 10.1086/510023

Lowes H, Pyle A, Duddy M, Hudson G. Cell-free mitochondrial DNA in progressive multiple sclerosis. *Mitochondrion*. 2019;46:307–12. doi: 10.1016/j.mito.2018.07.008

Lowes H, Pyle A, Santibanez-Koref M, Hudson G. Circulating cell-free mitochondrial DNA levels in Parkinson's disease are influenced by treatment. *Mol Neurodegener*. 2020;15(1):10. doi: 10.1186/s13024-020-00362-y

Lu B, Kwan K, Levine YA, Olofsson PS, Yang H, Li J, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor signaling inhibits inflammasome activation by preventing mitochondrial DNA release. *Mol Med*. 2014;20(1):350–8. doi: 10.2119/molmed.2013.00117

M

Magner M, Kolářová H, Honzik T, Švandová I, Zeman J. Clinical manifestation of mitochondrial diseases. *Dev period Med*. 2015;19(4):441–9. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102784

Maio M, Fiore C Di, Iannone A, Carriera F, Notardonato I, Avino P. Review of the Analytical Methods Based on HPLC-Electrochemical Detection Coupling for the Evaluation of Organic Compounds of Nutritional and Environmental Interest. *Analytica*. 2022;3(1):54–78. doi: 10.3390/analytica3010005

Mancuso M, McFarland R, Klopstock T, Hirano M, Artuch R, Bertini E, et al. International Workshop: outcome measures and clinical trial readiness in primary mitochondrial myopathies in children and adults. Consensus recommendations. 16–18 November 2016, Rome, Italy. *Neuromuscul Disord*. 2017;27(12):1126–37. doi: 10.1016/j.nmd.2017.08.006

Maresca A, Del Dotto V, Romagnoli M, La Morgia C, Di Vito L, Capristo M, et al. Expanding and validating the biomarkers for mitochondrial diseases. *J Mol Med*. 2020;98(10):1467–78. doi: 10.1007/s00109-020-01967-y

Miles M V. The uptake and distribution of coenzyme Q10. Vol. 7, *Mitochondrion*. 2007. p. S72-7. doi: 10.1016/j.mito.2007.02.012

Miles M V., Tang PH, Miles L, Steele PE, Moye MJ, Horn PS. Validation and application of an HPLC-EC method for analysis of coenzyme Q10 in blood platelets. *Biomed Chromatogr*. 2008;22(12):1403–8. doi: 10.1002/bmc.1072

Molyneux SL, Florkowski CM, Lever M, George PM. Biological variation of coenzyme Q10. *Clin Chem*. 2005;51(2):455–7. doi: 10.1373/clinchem.2004.043653

Montero R, Artuch R, Briones P, Nascimento A, García-Cazorla A, Vilaseca MA, et al. Muscle coenzyme Q10 concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders. *BioFactors*. 2005;25(1–4):109–15. doi: 10.1002/biof.5520250112

Montero R, Sánchez-Alcázar JA, Briones P, Hernández ÁR, Cordero MD, Trevisson E, et al. Analysis of coenzyme Q10 in muscle and fibroblasts for the diagnosis of CoQ10 deficiency syndromes. *Clin Biochem*. 2008;41(9):697–700. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.03.007

Montero R, Grazina M, López-Gallardo E, Montoya J, Briones P, Navarro-Sastre A, et al. Coenzyme Q10 deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. *Mitochondrion*. 2013;13(4):337–41. doi: 10.1016/j.mito.2013.04.001

Montero R, Yubero D, Salgado MC, González MJ, Campistol J, O’Callaghan M del M, et al. Plasma coenzyme Q10 status is impaired in selected genetic conditions. *Sci Rep*. 2019;9(1):793. doi: 10.1038/s41598-018-37542-2

Montini G, Malaventura C, Salviati L. Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency. *N Engl J Med*. 2008;358(26):2849–50. doi: 10.1056/NEJMc0800582

N

Nesbitt V, Pitceathly RDS, Turnbull DM, Taylor RW, Sweeney MG, Mudanohwo EE, et al. The UK MRC Mitochondrial Disease Patient Cohort Study: Clinical phenotypes associated with the m.3243A>G mutation - Implications for diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(8):936–8. doi: 10.1136/jnnp-2012-303528

Ng YS, Turnbull DM. Mitochondrial disease: genetics and management. *J Neurol*. 2016;263(1):179–91. doi: 10.1007/s00415-015-7884-3

Niklowitz P, Sonnenschein A, Janetzky B, Andler W, Menke T. Enrichment of coenzyme Q10 in plasma and blood cells: defense against oxidative damage. *Int J Biol Sci*. 2007;3(4):257–62. doi: 10.7150/ijbs.3.257

O

Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(7):2379–82. doi: 10.1073/pnas.86.7.2379

Okamoto T, Fukunaga Y, Ida Y, Kishi T. Determination of reduced and total ubiquinones in biological materials by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr.* 1988;430(1):11–9. doi: 10.1016/s0378-4347(00)83129-1

Orsucci D, Mancuso M, Ienco EC, LoGerfo A, Siciliano G. Targeting mitochondrial dysfunction and neurodegeneration by means of coenzyme Q10 and its analogues. *Curr Med Chem.* 2011;18(26):4053–64. doi: 10.2174/092986711796957257

P

Pan J, Ou Z, Cai C, Li P, Gong J, Ruan XZ, et al. Fatty acid activates NLRP3 inflammasomes in mouse Kupffer cells through mitochondrial DNA release. *Cell Immunol.* 2018;332:111–20. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.08.006

Parikh S, Goldstein A, Karaa A, Koenig MK, Anselm I, Brunel-Guitton C, et al. Patient care standards for primary mitochondrial disease: a consensus statement from the mitochondrial medicine society. *Genet Med.* 2017;19(12):1–18. doi: 10.1038/gim.2017.107

Parikh S, Karaa A, Goldstein A, Bertini ES, Chinnery PF, Christodoulou J, et al. Diagnosis of “possible” mitochondrial disease: an existential crisis. *J Med Genet.* 2019;56(3):123–30. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105800

Peñas A, Fernández-De la Torre M, Laine-Menéndez S, Lora D, Illescas M, García-Bartolomé A, et al. Plasma Gelsolin Reinforces the Diagnostic Value of FGF-21 and GDF-15 for Mitochondrial Disorders. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12). doi: 10.3390/ijms22126396

Petrangolini G, Ronchi M, Frattini E, De Combarieu E, Allegrini P, Riva A. A new food-grade coenzyme Q10 formulation improves bioavailability: single and repeated pharmacokinetic studies in healthy volunteers. *Curr Drug Deliv.* 2019 Sep 2;16(8):759–67. doi: 10.2174/1567201816666190902123147

Phadke R. Myopathology of Adult and Paediatric Mitochondrial Diseases. *J Clin Med.* 2017;6(7). doi: 10.3390/jcm6070064

Pitceathly RDS, Rahman S, Hanna MG. Single deletions in mitochondrial DNA - Molecular mechanisms and disease phenotypes in clinical practice. *Neuromuscul Disord.* 2012;22(7):577–86. doi: 10.1016/j.nmd.2012.03.009

Potgieter M, Pretorius E, Pepper MS. Primary and secondary coenzyme Q10 deficiency: The role of therapeutic supplementation. *Nutr Rev.* 2013;71(3):180–8. doi: 10.1111/nure.12011

Pravst I, Aguilera JCR, Rodriguez ABC, Jazbar J, Locatelli I, Hristov H, et al. Comparative bioavailability of different coenzyme Q10 formulations in healthy elderly individuals. *Nutrients.* 2020;12(3). doi: 10.3390/nu12030784

Q

Quinzii C, Naini A, Salviati L, Trevisson E, Navas P, DiMauro S, et al. A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet.* 2006;78(2):345–9. doi: 10.1086/500092

Quinzii CM, López LC, Gilkerson RW, Dorado B, Coku J, Naini AB, et al. Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ10 deficiency. *FASEB J.* 2010;24(10):3733–43. doi: 10.1096/fj.09-152728

Quinzii CM, Hirano M. Primary and secondary CoQ10 deficiencies in humans. *BioFactors.* 2011;37(5):361–5. doi: 10.1002/biof.155

R

Rahat B, Ali T, Sapehia D, Mahajan A, Kaur J. Circulating Cell-Free Nucleic Acids as Epigenetic Biomarkers in Precision Medicine. *Front Genet.* 2020;11(844). doi: 10.3389/fgene.2020.00844

Rahman S, Clarke CF, Hirano M. 176th ENMC International Workshop: Diagnosis and treatment of coenzyme Q10 deficiency. *Neuromuscul Disord.* 2012;22(1):76–86. doi: 10.1016/j.nmd.2011.05.001

Rahman J, Rahman S. Mitochondrial medicine in the omics era. *Lancet*. 2018;391(10139):2560–74. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30727-X

Rath S, Sharma R, Gupta R, Ast T, Chan C, Durham TJ, et al. MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D1541–7. doi: 10.1093/nar/gkaa1011

Rodríguez-Aguilera J, Cortés A, Fernández-Ayala D, Navas P. Biochemical assessment of coenzyme Q10 deficiency. *J Clin Med*. 2017;6(3):27. doi: 10.3390/jcm6030027

Ruiz-Jiménez J, Priego-Capote F, Mata-Granados JM, Quesada JM, Luque de Castro MD. Determination of the ubiquinol-10 and ubiquinone-10 (coenzyme Q10) in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry to evaluate the oxidative stress. *J Chromatogr A*. 2007;1175(2):242–8. doi: 10.1016/j.chroma.2007.10.055

S

Sacconi S, Trevisson E, Salviati L, Aymé S, Rigal O, Garcia Redondo A, et al. Coenzyme Q10 is frequently reduced in muscle of patients with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul Disord*. 2010;20(1):44–8. doi: 10.1016/j.nmd.2009.10.014

Salviati L, Trevisson E, Doimo M, Navas P. Primary Coenzyme Q10 Deficiency - GeneReviews® - NCBI Bookshelf [Internet]. 2017 [cited 2022 Sep 1]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK410087/>

Saudubray JM, Baumgartner MR, García-Cazorla A, Walter J. *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment*. 7th ed. Springer; 2022.

Scalais E, Chafai R, Van Coster R, Bindl L, Nuttin C, Panagiotaraki C, et al. Early myoclonic epilepsy, hypertrophic cardiomyopathy and subsequently a nephrotic syndrome in a patient with CoQ10 deficiency caused by mutations in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2). *Eur J Paediatr Neurol*. 2013;17(6):625–30. doi: 10.1016/j.ejpn.2013.05.013

Schou-Pedersen AM V., Schemeth D, Lykkesfeldt J. Determination of Reduced and Oxidized Coenzyme Q 10 in Canine Plasma and Heart Tissue by HPLC-ECD: Comparison with LC-MS/MS Quantification. *Antioxidants*. 2019;8(8). doi: 10.3390/antiox8080253

Stenton SL, Prokisch H. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *eBioMedicine*. 2020;56:102784. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102784

Strelau J, Schober A, Sullivan A, Schilling L, Unsicker E. Growth/differentiation factor-15 (GDF-15), a novel member of the TGF-beta superfamily, promotes survival of lesioned mesencephalic dopaminergic neurons in vitro and in vivo and is induced in neurons following cortical lesioning. *J Neural Transm Suppl*. 2003;(65):197–203. doi: 10.1007/978-3-7091-0643-3_12

Suomalainen A, Elo JM, Pietiläinen KH, Hakonen AH, Sevastianova K, Korpela M, et al. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol*. 2011;10(9):806–18. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70155-7

T

Tanji K, Schon EA, Dimauro S, Bonilla E. Kearns-Sayre syndrome: oncocyctic transformation of choroid plexus epithelium. *J Neurol Sci*. 2000;178(1):29–36. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00354-3

Thurairajah K, Briggs GD, Balogh ZJ. The source of cell-free mitochondrial DNA in trauma and potential therapeutic strategies. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2018;44(3):325–34. doi: 10.1007/s00068-018-0954-3

Tomasetti M, Alleva R, Collins AR. In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage. *FASEB J*. 2001;15(8):1425–7. doi: 10.1096/fj.00-0694fje

Trevisson E, Dimauro S, Navas P, Salviati L. Coenzyme Q deficiency in muscle. *Curr Opin Neurol*. 2011;24(5):449–56. doi: 10.1097/WCO.0b013e32834ab528

Trifunov S, Pyle A, Valentino ML, Liguori R, Yu-Wai-Man P, Burté F, et al. Clonal expansion of mtDNA deletions: different disease models assessed by digital droplet PCR in single muscle cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–10. doi: 10.1038/s41598-018-30143-z

Tsygankova PG, Itkis YS, Krylova TD, Kurkina M V., Bychkov IO, Ilyushkina AA, et al. Plasma FGF-21 and GDF-15 are elevated in different inherited metabolic diseases and are not diagnostic for mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2019;42(5):918–33. doi: 10.1002/jimd.12142

Turkowicz MJ, Karpińska J. Analytical problems with the determination of coenzyme Q10 in biological samples. *BioFactors*. 2013;39(2):176–85. doi: 10.1002/biof.1058

Turunen M, Wehlin L, Sjöberg M, Lundahl J, Dallner G, Brismar K, et al. β 2-integrin and lipid modifications indicate a non-antioxidant mechanism for the anti-atherogenic effect of dietary coenzyme Q10. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296(2):255–60. doi: 10.1016/s0006-291x(02)00871-9

Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1660(1–2):171–99. doi: 10.1016/j.bbamem.2003.11.012

V

Vianey-Saban C, Guffon N, Delolne F, Guibaud P, Mathieu M, Divry P. Diagnosis of inborn errors of metabolism by acylcarnitine profiling in blood using tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis*. 1997;20(3):411–4. doi: 10.1023/a:1005306818025

Villalba JM, Parrado C, Santos-Gonzalez M, Alcain FJ. Therapeutic use of coenzyme Q10 and coenzyme Q10-related compounds and formulations. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010;19(4):535–54. doi: 10.1517/13543781003727495

Viscomi C, Zeviani M. mtDNA-maintenance defects: syndromes and genes. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40(4):587–99. doi: 10.1007/s10545-017-0027-5

W

Wang Y, Hekimi S. Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48(1):69–88. doi: 10.3109/10409238.2012.741564

Witters P, Saada A, Honzik T, Tesarova M, Kleinle S, Horvath R, et al. Revisiting mitochondrial diagnostic criteria in the new era of genomics. *Genet Med*. 2018;20(4):444–51. doi: 10.1038/gim.2017.125

Y

Yépez VA, Gusic M, Kopajtich R, Mertes C, Smith NH, Alston CL, et al. Clinical implementation of RNA sequencing for Mendelian disease diagnostics. *Genome Med*. 2022;14(1):1–26. doi: 10.1186/s13073-022-01019-9

Yubero D, Montero R, Ramos M, Neergheen V, Navas P, Artuch R, et al. Determination of urinary coenzyme Q10 by HPLC with electrochemical detection: Reference values for a paediatric population. *BioFactors*. 2015;41(6):424–30. doi: 10.1002/biof.1242

Yubero D, Montero R, Martín MA, Montoya J, Ribes A, Grazina M, et al. Secondary coenzyme Q10 deficiencies in oxidative phosphorylation (OXPHOS) and non-OXPHOS disorders. *Mitochondrion*. 2016;30:51–8. doi: 10.1016/j.mito.2016.06.007

Yubero D, Montero R, Santos-Ocaña C, Salviati L, Navas P, Artuch R. Molecular diagnosis of coenzyme Q10 deficiency: an update. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(6):491–8. doi: 10.1080/14737159.2018.1478290

Z

Zeviani M, Viscomi C. Mitochondrial Neurodegeneration. *Cells*. 2022;11(4). doi: 10.3390/cells11040637

Zheng J, Bi J, Johnson D, Sun Y, Song M, Qiu P, et al. Analysis of 10 metabolites of polymethoxyflavones with high sensitivity by electrochemical detection in high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 2015;63(2):509–16. doi: 10.1021/jf505545x

Zhong S, Ng MCY, Lo YMD, Chan JCN, Johnson PJ. Presence of mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) A to G 3243 mutation in DNA extracted from serum and plasma of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Pathol*. 2000;53(6):466–9. doi: 10.1136/jcp.53.6.466

Zhou S, Zhang Y, Davie A, Marshall-Gradisnik S, Hu H, Wang J, et al. Muscle and plasma coenzyme Q10 concentration, aerobic power and exercise economy of healthy men in response to four weeks of supplementation. *J Sports Med Phys Fitness*. 2005;45(3):337–46.

APÉNDICE

OTRAS PUBLICACIONES

1. *Impairment of the mitochondrial one-carbon metabolism enzyme SHMT2 causes a novel brain and heart developmental syndrome.* Àngels García-Cazorla, Edgard Verdura, Natalia Juliá-Palacios, Eric N. Anderson, Leire Goicoechea, Laura Planas-Serra, Enkhtuul Tsogtbaatar, Nikita R. Dsouza, Agatha Schlüter, Roser Urreizti, Jessica M. Tarnowski, Ralitza H. Gavrilova, SHMT2 Working Group, Montserrat Ruiz, Agustí Rodríguez-Palmero, Stéphane Fourcade, Benjamin Cogné, Thomas Besnard, Marie Vincent, Stéphane Bézieau, Clifford D. Folmes, Michael T. Zimmermann, Eric W. Klee, Udai Bhan Pandey, Rafael Artuch, Margot A. Cousin, Aurora Pujol. **Acta Neuropathologica** 2020 Dec;140(6):971-975.
2. *The Genetic Landscape of Mitochondrial Diseases in Spain: A Nationwide Call.* Marcello Bellusci, Abraham J Paredes-Fuentes, Eduardo Ruiz-Pesini, Beatriz Gómez, MITOSPAIN Working Group, Miguel A Martín, Julio Montoya, Rafael Artuch. **Genes (Basel)** 2021 Oct 9;12(10):1590.
3. *Plasma idebenone monitoring in Friedreich's ataxia patients during a long-term follow-up.* Abraham J Paredes-Fuentes, Sergi Cesar, Raquel Montero, Cristina Latre, Jordi Genovès, Loreto Martorell, Daniel Cuadras, Helena Colom, Mercè Pineda, Maria del Mar O'Callaghan, Georgia Sarquella-Brugada, Alejandra Darling, Rafael Artuch. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 2021 Nov; 143:112143.

Fuera del ámbito de esta tesis, me gustaría destacar que he tenido la oportunidad de participar en el primer estudio epidemiológico de enfermedades mitocondriales llevado a cabo en España (segunda publicación de las indicadas en el listado de arriba). En este trabajo, que recoge 2.761 casos de casi la totalidad de las provincias españolas durante el período comprendido entre 1990 y 2020, participaron 39 hospitales y centros de diagnóstico. Este estudio supone el primer paso en la consolidación de un registro español de enfermedades mitocondriales, que permitirá la colaboración con otros registros a nivel mundial, fomentar la investigación y atraer ensayos clínicos.