

**DISFERLINOPATÍAS: NUEVOS ASPECTOS DIAGNÓSTICOS Y TERAPÉUTICOS**

**Doctorando: Jordi Díaz Manera**

**Directora de tesis: Dra. Isabel Illa Sendra**



### **Agradecimientos:**

A Isabel, por ser un ejemplo de constancia en el trabajo y de autosuperación, por haberme enseñado a creer en mis posibilidades, por haber confiado en mí desde el primer momento y por haberme aconsejado en todos los momentos difíciles de mi vida personal y profesional.

A Eduard, por ser el soporte necesario de forma continuada, por las horas perdidas hablando sobre ciencia y la no ciencia en su despacho o en cualquier lugar, por la ayuda personal y por los consejos.

A todos los compañeros del laboratorio de Sant Pau, a Noemi, Bárbara, Miquel, Gisela, Eugenia, Xavi, Anna, Fina y Esther, por su ayuda en la realización de los experimentos y por hacer del trabajo en el laboratorio una experiencia divertida.

A todos los colegas del laboratorio de Milán, por hacer de mi estancia allí una experiencia inolvidable.

A Giulio Cossu, por su paciencia, sus consejos, sus opiniones, por su experiencia y por permitirme disfrutar de un año y medio en el Milán, rodeado de buena gente aprendiendo sin parar.

A mis compañeros del hospital, en especial a Luis, Ricard, Aida, Sergi y Alex, por aguantarme en los momentos pesados y echarme una mano cuando los necesitaba.

A mis padres y mis hermanas por haberme ayudado siempre en lo que he necesitado. A mis hijas Sofía y Blanca por las horas de no ir al parque mientras papá está en el ordenador. A Estela por los años compartidos. A Sonia, por estar.



## **Índice**

|                                              |             |
|----------------------------------------------|-------------|
| 1. Introducción.....                         | página 7.   |
| 2. Hipótesis y objetivos .....               | página 65.  |
| 3. Resultados .....                          | página 71.  |
| a. 3.1 Artículo 1 .....                      | página 73.  |
| b. 3.2 Artículo 2 .....                      | página 79.  |
| c. 3.3 Artículo 3 .....                      | página 89.  |
| d. 3.4 Artículo 4 .....                      | página 101. |
| 4. Discusión general de los resultados ..... | página 113. |
| 5. Conclusiones .....                        | página 121. |
| 6. Resumen en inglés.....                    | página 125. |



## **INTRODUCCIÓN**





## **1. Introducción:**

### **A. ¿Qué son las distrofias musculares?.**

Las distrofias musculares son enfermedades de origen genético caracterizadas por una progresiva destrucción del tejido muscular esquelético. La sintomatología de los pacientes puede iniciarse en cualquier momento de la vida, desde el nacimiento hasta la vejez (1). En todos los casos existe una debilidad muscular progresiva que afecta a diferentes grupos musculares. La evolución es generalmente lenta pero todos los pacientes acaban teniendo una discapacidad física en mayor o menor grado (2). En ocasiones la distrofia muscular puede producir la muerte del paciente por disfunción cardíaca o por complicaciones respiratorias (3). Actualmente no existe un tratamiento curativo para ninguna de las distrofias musculares conocidas (4).

Las distrofias musculares se caracterizan por una serie de cambios histológicos típicos: presencia de fibras degenerantes y regenerativas, núcleos centrales en un gran número de fibras musculares, incremento en la variabilidad del tamaño de las fibras y aumento del tejido conectivo y graso (5). Si bien el resultado histológico final es común, la causa de la enfermedad es diferente en función de cada tipo de distrofia muscular.

Existen diferentes formas de clasificar las distrofias musculares. Desde el punto de vista clínico podemos diferenciar entre distrofia muscular de cinturas (aquellas en las que la musculatura que se afecta inicialmente es la proximal de las extremidades superiores e inferiores) y miopatías distales (aquellas en las que los músculos distales de las

extremidades superiores y/o inferiores son los primeros en debilitarse). Desde el punto de vista genético clasificamos las distrofias musculares en función del patrón de herencia: autosómica dominante, autosómica recesiva, herencia ligada al cromosoma X o esporádica (6). En los últimos 20 años se han descrito un amplio número de genes causantes de estas enfermedades (3, 7). Pero a pesar de los esfuerzos realizados para detectar qué gen se encuentra alterado en cada una de las distrofias musculares, se calcula que en un 30 a un 50% de los casos no se sabe cuál es la alteración genética que produce la enfermedad (8). Esta tesis se centra en el estudio de una de estas distrofias musculares, la disferlinopatía producida por mutaciones en el gen *DYSF*.

## **B. Disferlinopatía: definición, clínica y diagnóstico.**

Se conocen como disferlinopatías un grupo de enfermedades musculares con herencia autosómica recesiva producidas por una mutación en el gen *DYSF* que codifica la proteína disferlina. El inicio de la enfermedad es durante la adolescencia o bien en la segunda o tercera década de la vida en la mayoría de los casos (9). No obstante se han descrito pacientes con inicio infantil y también con inicio tardío (10, 11).

Se han definido siete fenotipos diferentes:

1. Distrofia muscular de cinturas 2B (LGMD-2B): Las series publicadas indican que ésta es la forma de presentación en un 25% de los pacientes (2). Se caracteriza por una afectación inicial predominante de la musculatura proximal de la cintura pélvica, especialmente los músculos psoas y cuádriceps. Posteriormente, se afecta la musculatura de la cintura escapular, siendo característica una atrofia parcial de la porción distal del músculo bíceps (figura 1), y la musculatura distal posterior de las piernas. En fases avanzadas, los pacientes presentan una debilidad muscular

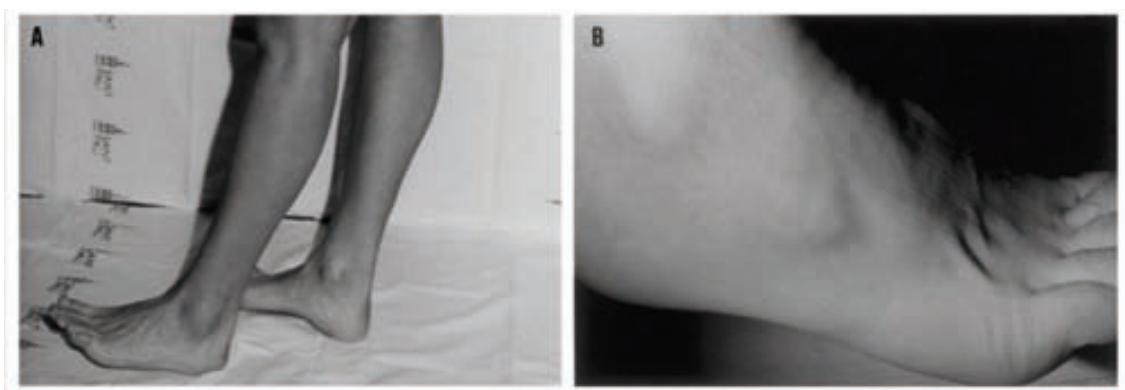
generalizada que respeta musculatura facial, bulbar y la intrínseca de las manos. En algunos casos la debilidad afecta desde el inicio a la musculatura proximal y distal de las extremidades inferiores, conociéndose este grupo como forma próximo-distal (9). En general, todos los pacientes precisan algún tipo de ayuda para caminar, bien sea el uso de bastones o muletas bien sea el uso de una silla de ruedas, tras 20 años del inicio de los síntomas (11).



**Figura 1:** Atrofia parcial bíceps

2. Miopatía distal de Miyoshi: Esta forma fue descrita inicialmente en Japón en el año 1986 (12). Afecta aproximadamente al 25% de los pacientes diagnosticados de disferlinopatía (2). En este grupo el primer síntoma acostumbra a ser una dificultad para poder caminar de puntillas, con atrofia de la musculatura distal posterior de las piernas (gemelos y soleo). Algunos pacientes debutan con dolor y engrosamiento de los gemelos. Posteriormente desarrollan una debilidad muscular y una atrofia de los gemelos. Finalmente se produce una progresión de la debilidad muscular que acaba afectando a ambos cuádriceps, a la musculatura posterior del muslo, a la musculatura pélvica y de la cintura escapular. En fases moderadas o avanzadas de la enfermedad no es posible diferenciar fenotípicamente un inicio de tipo distal de un inicio proximal(13).

3. Miopatía distal anterior: Los pacientes presentan inicialmente debilidad de la musculatura distal anterior de las piernas (14), especialmente tibial anterior y extensor de los dedos (figura 2). La progresión de la enfermedad es rápida, afectando a los músculos de la cintura pélvica, a los músculos flexores de los dedos de las manos y en fases finales a la musculatura proximal de los brazos (15).



**Figura 2:** Debilidad del músculo tibial anterior en un caso de miopatía distal anterior producida por una mutación en el gen de la disferlina (*Illa et al, Annals of Neurology* 2007).

4. Hiperckemia: Entre un 5 y un 10% de los pacientes, la enfermedad se diagnostica por el hallazgo de forma casual de cifras elevadas de creatinquinasa (Ck) en sangre (2).

5. Forma neonatal: Este fenotipo ha sido descrito únicamente en una familia hasta el momento (10). El inicio de la debilidad se produce de forma congénita o neonatal, siendo característico una hipotonía generalizada y un retraso en la adquisición de la marcha. Los pacientes desarrollan una debilidad de la cintura pélvica asociada a debilidad de la musculatura flexora cervical (figura 3).



**Figura 3:** Debilidad muscular en dos casos de distrofia muscular congénita por déficit de disferlina (*Paradas et al, Neuromuscular Disorders, 2009*).

6. Miopatía axial: Se han descrito dos pacientes que debutaron con debilidad de la musculatura paraespinal. En ambos casos la clínica se inició a partir de los 50 años en forma de dolor lumbar e hiperlordosis. Los estudios de imagen mostraron afectación de la musculatura paraespinal, pero también del grupo posterior de muslos y piernas (16, 17).

7. Portadores sintomáticos: A pesar de ser una enfermedad con herencia autosómica recesiva, se han descrito síntomas en al menos dos pacientes portadores de una única mutación en el gen *DYSF* y con una reducción parcial de la expresión de disferlina en músculo (18). En ambos casos los pacientes presentaban una atrofia parcial de los gemelos y una debilidad leve de la musculatura proximal y/o distal anterior o posterior de las piernas.

Estos diferentes fenotipos pueden estar presentes en miembros de la misma familia que comparten la misma mutación, no siendo excepcional encontrar un hermano que debuta con debilidad proximal y otro que lo hace con debilidad distal (19).

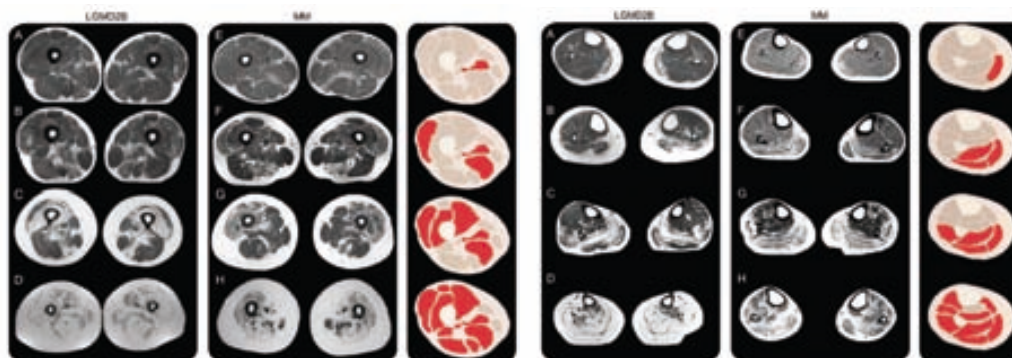
#### Diagnóstico:

Una vez establecida la sospecha clínica de una disferlinopatía, los estudios complementarios que se realizan para confirmar el diagnóstico son:

1. Analítica sanguínea: Es característica una elevación muy marcada de las cifras de Ck, que oscilan entre 35 y 200 veces la normalidad (20). Se ha descrito un descenso en las cifras de Ck a medida que la enfermedad progresa (9).

2. Estudios radiológicos: Se han realizado estudios de imagen muscular en pacientes afectados de una disferlinopatía usando tanto TAC como RM muscular (21-23). Nuestro grupo publicó en el año 2010 los resultados obtenidos en una serie de 29 pacientes con diferentes fenotipos de la enfermedad seguidos con RM muscular durante un período medio de 6,4 años (figura 4) (13). En primer lugar pudimos demostrar que los hallazgos radiológicos no permitían diferenciar entre un fenotipo LGMD-2B y una miopatía distal de Miyoshi. En segundo lugar, observamos un patrón de afectación progresiva muscular. En fases iniciales podía detectarse afectación de ambos gemelos y del adductor mayor en las secuencias T1. Posteriormente se afectaba la musculatura del muslo, tanto del compartimento anterior (vasto medial, lateral e intermedio, conservándose el recto femoral hasta fases finales de la enfermedad) como del compartimento posterior (semitendinoso, semimembranoso y en fases avanzadas bíceps crural). En cuanto a la musculatura de las piernas, el músculo soleo se afectaba en fases

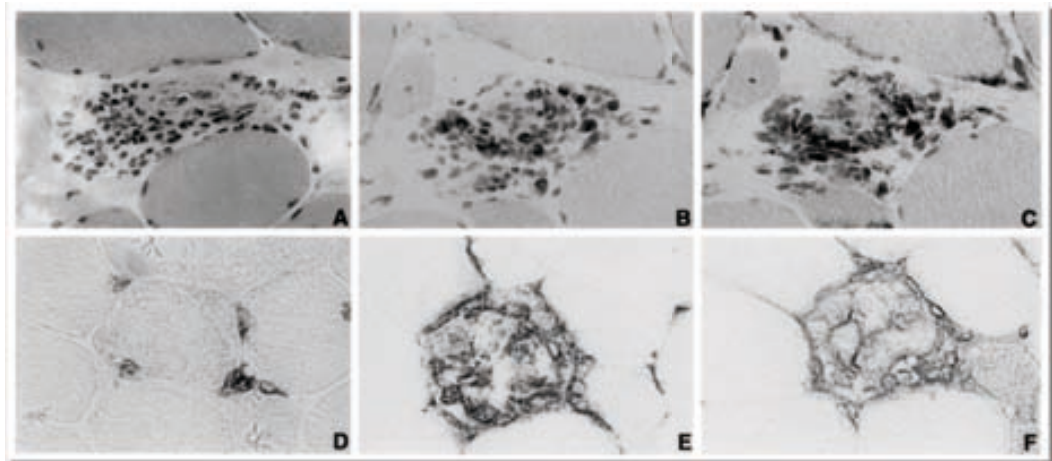
medias de la enfermedad y sólo en fases avanzadas se apreciaba una atrofia de la musculatura anterior (tibial anterior y peroneos). Los músculos *gracilis* y *sartorius* no se afectaban en ningún momento. A diferencia del resto, los pacientes con un fenotipo distal anterior tenían una afectación selectiva del compartimento antero-distal de las extremidades inferiores en fases iniciales de la enfermedad (14). Cuando se estudiaron los pacientes con secuencias STIR, que permiten detectar el edema muscular, fue posible detectar una señal aumentada en los músculos adductor mayor y gemelo interno, especialmente en aquellos pacientes en fase iniciales de la enfermedad. Existen pocos trabajos que hayan recogido los cambios radiológicos de las extremidades superiores. Kesper y colaboradores describieron cambios en los músculos subescapular, redondo mayor, dorsal ancho y en menor medida del supraespinoso en 3 pacientes afectados de disferlinopatía (24).



**Figura 4:** Patrón de afectación progresiva en pacientes con disferlinopatías en fases iniciales, medias, avanzadas y finales de la enfermedad (*Paradas et al, Neurology 2010*)

3. Biopsia muscular: Los hallazgos patológicos son los típicos de una distrofia muscular. Existen no obstante una serie de datos característicos, especialmente la presencia de infiltrados inflamatorios que pueden encontrarse de forma difusa a lo largo de la biopsia o concentrados alrededor de fibras necróticas. El infiltrado se compone de macrófagos y linfocitos T CD4+, aunque pueden observarse en ocasiones linfocitos T

CD8+ (25). Existe expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) únicamente en las fibras degenerantes lo que permite diferenciar este proceso distrófico de una miopatía inflamatoria (figura 5).



**Figura 5:** Caracterización del infiltrado inflamatorio en una biopsia muscular de un paciente con una distrofia muscular por déficit de disferlina. A: Hematoxilina & eosina. B y D: linfocitos T identificados con anticuerpos dirigidos contra linfocitos T CD8. C y E: macrófagos identificados con anticuerpos anti-CD68. F: MHC-I. (*Gallardo et al, Neurology 2001*)

Es posible detectar la presencia de disferlina en la membrana de las fibras musculares usando anticuerpos específicos. En pacientes con una disferlinopatía confirmada genéticamente se han descrito diferentes patrones de expresión: ausencia completa de disferlina, tinción granular en citoplasma de algunas fibras degenerantes y/o regenerativas y en ocasiones un patrón parcheado en la membrana muscular de fibras aisladas (26, 27). Los pacientes portadores sintomáticos tienen una expresión parcheada de disferlina en la mayoría de las fibras (18). Una expresión reducida de disferlina puede también observarse de forma secundaria en otras distrofias musculares como el déficit de calpaína-3 o de caveolina-3 (28, 29).

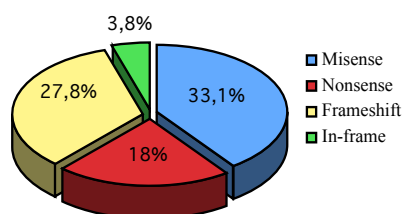


La cuantificación de la expresión de disferlina mediante Western-Blot (WB) es más específica ya que una ausencia o reducción significativa tan sólo se ha detectado en déficits primarios de disferlina, y no en los secundarios a mutaciones en otros genes. En el músculo normal la disferlina se detecta en WB como una banda de unos 240 KDa, pero además es posible detectar múltiples bandas de tamaño menor, que probablemente correspondan a fragmentos de la disferlina ya que desaparecen en el WB de los pacientes.

Los hallazgos más destacables demostrados mediante microscopía electrónica de las biopsias musculares son la presencia de agujeros en la membrana plasmática de un tamaño entre 0,11 y 1,8 micras, el engrosamiento o duplicación de la lámina basal y la presencia de pequeñas vacuolas subsarcolémicas, que pueden estar vacías o contener material de degradación de la membrana (30, 31).

4. Estudio en monocitos de sangre periférica: Los monocitos de sangre periférica expresan disferlina, lo que los convierte en una herramienta útil para el estudio de la expresión de dicha proteína en individuos sanos o con sospecha de una distrofia muscular (32). Estas células pueden separarse del resto de los componentes sanguíneos gracias a la expresión selectiva del marcador CD-14. Una vez aisladas, es posible estudiar la expresión de disferlina mediante WB permitiendo detectar de forma sencilla pacientes sin expresión alguna de la proteína, otros con expresión reducida de la misma (portadores) e individuos sanos con una expresión normal (32). Al mismo tiempo, los monocitos aportan mRNA para poder realizar el estudio genético de la disferlina y confirmar la enfermedad (33).

5. *Estudios genéticos:* el gen de la disferlina se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma 2. Se trata de un gen de gran tamaño, contiene alrededor de 150000 pares de bases (pb) que codifican un cDNA de aproximadamente 7 kilobases (kb). Existen 55 exones, con tamaños que varían desde 30 hasta 461 pb. Se han descrito 14 isoformas expresadas en diferentes tejidos (34). Existen una serie de factores que complican el estudio del gen DYSF, por un lado su gran tamaño, por otro el amplio espectro de mutaciones descritas y finalmente la existencia de numerosas mutaciones “privadas”. Existen en el momento actual dos bases de datos informatizadas que registran las mutaciones descritas. La más antigua de ellas es la Leiden Open Variation Database ([www.lovd.nl/DYSF](http://www.lovd.nl/DYSF)) que contiene 424 variantes del gen, 300 de ellas consideradas mutaciones patogénicas. En el año 2011, el grupo dirigido por el Dr. Krahn creó un nuevo registro que tiene registradas 266 mutaciones patogénicas ([www.umd.be/DYSF](http://www.umd.be/DYSF)). Las mutaciones de esta última base se han clasificado como mutaciones puntuales (65%), deleciones (20%), duplicaciones (9%), inserciones (2%) y la combinación de inserción/duplicación (2%)(34). El 82,7% de las mutaciones descritas afectan a exones (figura 6), mientras que en un 17,3% afectan a intrones. Las mutaciones se distribuyen a lo largo de todo el gen DYSF, sin que existan “zonas calientes” con alta prevalencia de mutaciones dentro del gen (34).



**Figura 6:** Tipo de mutaciones exónica

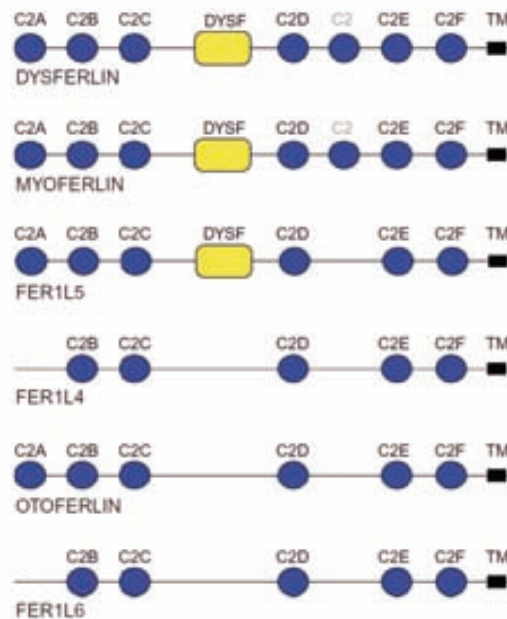
Se han descrito 7 mutaciones fundadoras en pacientes de varios orígenes geográficos o étnicos (35-41). No existe una buena correlación fenotipo-genotipo, ya que una misma mutación puede dar lugar a diversos fenotipos de la enfermedad.

En el momento de plantear el estudio del gen DYSF, se puede utilizar tanto DNA como RNA. En general se utiliza RNA extraído de monocitos de sangre periférica o de musculo esquelético. Este RNA mensajero se retrotranscribe a cDNA, permitiendo el estudio de mutaciones que afecten a alguno de los 55 exones del gen. Los pacientes pueden ser homocigotos por una mutación determinada, o heterocigotos por dos mutaciones diferentes. No es infrecuente hallar pacientes con más de dos mutaciones en el gen. Una de las cuestiones de debate es el hallazgo habitual de una sola mutación en uno de los dos alelos del gen de disferlina. Se ha propuesto como solución el estudio del promotor del gen DYSF o las regiones intrónicas (42).

### **C. Disferlina: descripción estructural y funcional.**

La disferlina pertenece a una familia de proteínas conocidas como ferlinas. Este grupo se define por la similitud de su secuencia con la proteína *fer-1* de *C.elegans*. Se trata de proteínas de tipo II, es decir con el extremo N-terminal y la mayoría del resto de la secuencia de aminoácidos localizada en el citoplasma, mientras que el extremo C-terminal se encuentra por fuera del sarcolema (43). Esta familia de proteínas contiene un número variable de dominios C2 en su estructura. Se ha demostrado que en presencia de calcio estos dominios pueden unirse a diferentes moléculas (figura 7) (44). En los humanos existen 6 proteínas de esta familia, todas ellas con una estructura similar. Contienen un número variable de dominios C2, que se denominan de forma consecutiva desde el extremo amino terminal al extremo carboxi terminal con las letras del abecedario (C2A-C2F). Se conoce que existe una gran homogeneidad entre los mismos

dominios C2 en las diferentes proteínas de la familia. Por ejemplo el dominio C2A de la disferlina es mucho más parecido al dominio C2A de la mioferlina, que al resto de los dominios C2 de la propia disferlina. La proteína disferlina tiene un peso molecular de 230 KDa y contiene al menos 6 dominios C2.



**Figura 7:** Representación esquemática de las diferentes proteínas que forman parte de la familia de las ferlinas. Todas ellas contienen dominios C2, que muestran una gran homogeneidad (*Posey et al, Curren Topics in Developmental Biology 2011*).

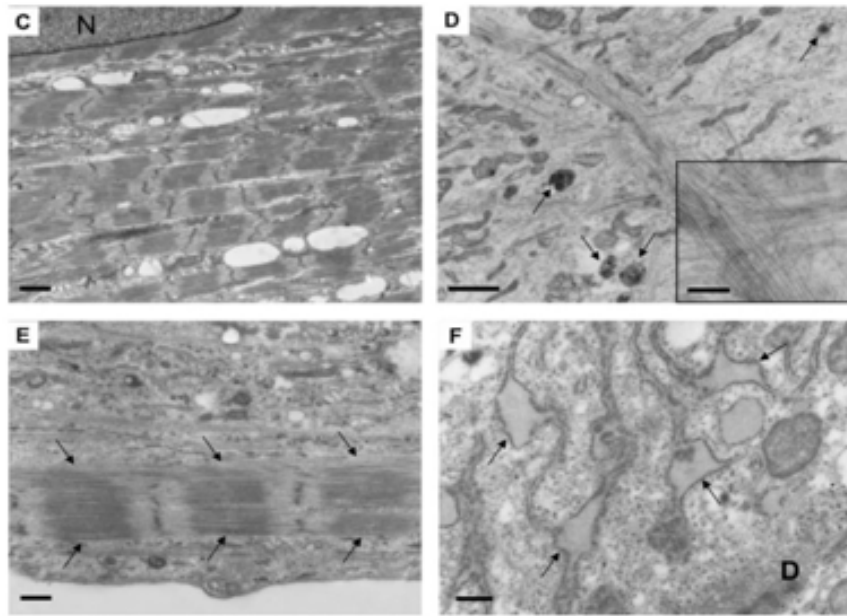
La disferlina se expresa en diversos tejidos del cuerpo incluyendo músculo liso, cardíaco y esquelético, pero también en monocitos de sangre periférica, placenta, cerebro o riñón (45). En músculo esquelético se sitúa en el sarcolema de las fibras musculares. Estudios realizados en miotubos de C2C12 han demostrado que se localiza también en los túbulos T (46). Se ha sugerido que la disferlina puede desplazarse rápidamente desde el túbulo T al sarcolema en respuesta a un daño muscular gracias a su interacción con la tubulina (47). Los músculos deficitarios en disferlina muestran una

alteración en el desarrollo de los túbulos T sugiriendo que una de las posibles funciones de la disferlina sea la formación de los mismos (48).

La función de la proteína se ha estudiado especialmente en músculo esquelético. Si bien no se conoce con exactitud, se ha postulado que puede estar relacionado con diferentes procesos tanto en la formación del músculo esquelético como en la reparación de la membrana muscular.

Los estudios realizados *in vitro* han mostrado que los mioblastos expresan poca cantidad de disferlina (26). Durante la diferenciación hacia músculo esquelético, la expresión de disferlina aumenta, especialmente cuando se observan miotubos en las placas de cultivo. Es característica la presencia de disferlina en los extremos de crecimiento de los miotubos (14). Los mioblastos procedentes de músculos disferlina negativos proliferan a una velocidad normal, pero en cambio el proceso de diferenciación a miotubo se encuentra alterado, ya que aunque son capaces de fusionar entre ellos, lo hacen de forma tardía, menos efectiva y produciendo miotubos con anomalías estructurales graves (Figura 8) (13).

Estos datos parecen indicar que la disferlina es una proteína necesaria para la formación del tejido muscular esquelético. En este sentido cabe destacar que se ha detectado expresión de disferlina ya en las 5 semanas del desarrollo embrionario humano (45), si bien no se han descrito hasta el momento, alteraciones embrionarias ni en humanos ni en ratones con déficit de disferlina. Por el contrario, los estudios realizados con mioblastos murinos no han detectado ningún déficit en la formación de miotubos (49), sugiriendo que o bien la función de la disferlina no es fundamental para la diferenciación hacia músculo esquelético o bien, otras proteínas pueden suplir su función en este modelo animal.



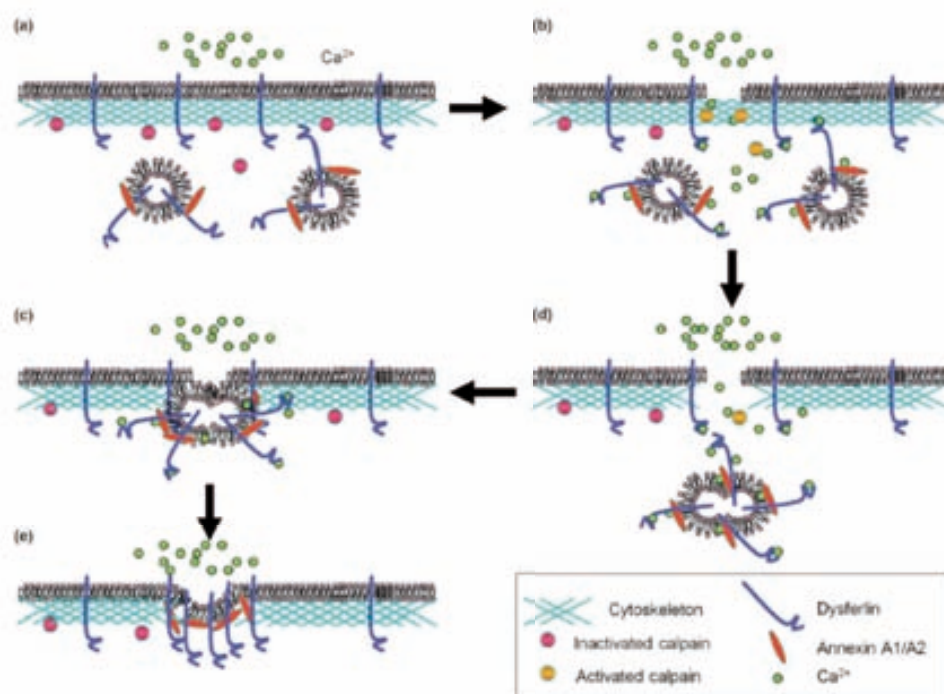
**Figura 8:** Microscopía electrónica de miotubos originados a partir de mioblastos disferlina negativos. C y E: miotubos disferlina positivos con miofibrillas ordenadas de forma correcta. D: miotubos disferlina negativos con desestructuración de las miofibrillas y la presencia de abundantes lisosomas. F: Miotubos disferlina negativos, mostrando un ensanchamiento del retículo endoplásmico.

(De Luna et al, JBC 2006)

En biopsias musculares de pacientes con distrofias musculares, se ha detectado que las células satélite expresan disferlina cuando se activan abandonando la fase de quiescencia antes de fusionar con las fibras musculares. (26). Estos datos sugieren que la disferlina podría ser una proteína necesaria para iniciar y facilitar el proceso de regeneración muscular *in vivo*.

Se ha sugerido que la disferlina podría tener un papel importante en la reparación de la membrana muscular. Esta afirmación se basa en la detección mediante microscopía electrónica de vesículas subsarcolémicas situadas justo por debajo de la membrana

muscular. Pero además, se apoya en la existencia de un defecto en la fusión de la vesículas citoplasmáticas con la membrana celular de los espermatozoos mutantes con déficit de *fer-1*, una proteína homóloga a la disferlina presente en el modelo animal *C. elegans*. De hecho se sabe que el dominio C2A de la disferlina se une a fosfolípidos en presencia de calcio, lo que podría permitirle fijar vesículas intracitoplasmáticas y, participar de algún modo en la fusión de las mismas con la membrana muscular (50). Los estudios funcionales realizados mediante diversos experimentos han mostrado como las fibras musculares deficitarias en disferlina son incapaces de reparar la membrana tras haberse producido una lesión en la misma (51, 52). Se ha descrito un modelo por el que una hipotética lesión de la membrana muscular permitiría la entrada masiva de calcio al interior de la fibra muscular, lo que activaría la unión de la disferlina a vesículas intracitoplasmáticas, y favorecería el desplazamiento de las mismas hasta la membrana para actuar como un parche y sellar la membrana muscular (figura 9).



**Figura 9:** Modelo propuesto de activación de la disferlina en las fibras musculares.

(Han and Campbell, *Current Opinion in Cell Biology*, 2007).

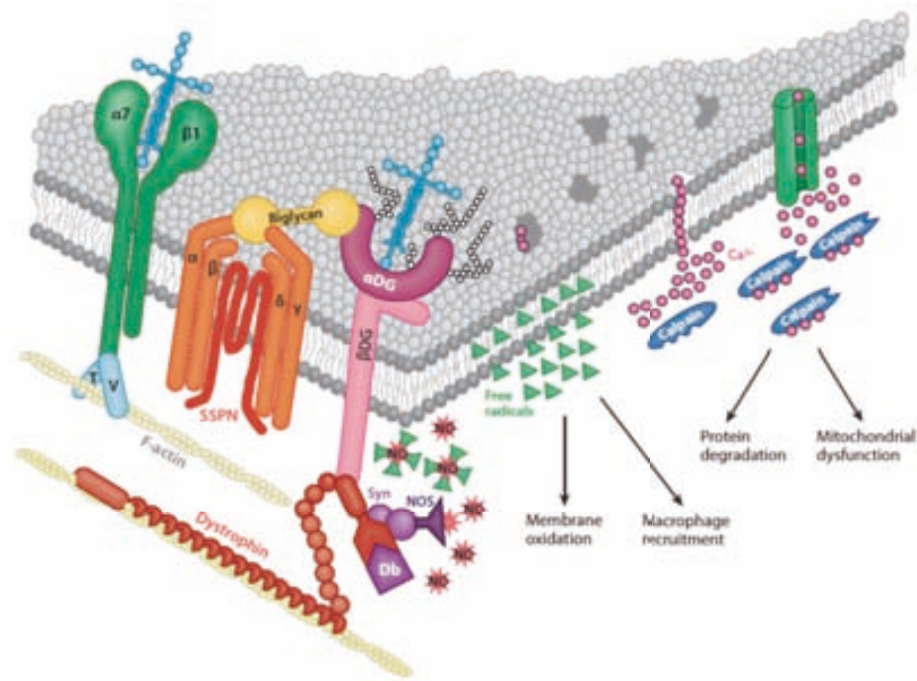
Cabe destacar que a diferencia de otras proteínas causantes de distrofias musculares, los estudios de inmunoprecipitación no han demostrado que la disferlina se una a ninguna de las proteínas del complejo distrofina-sarcoglicano-distroglicano (51). Sin embargo, se han descrito interacciones con un gran número de proteínas intracelulares, muchas de ellas relacionadas con procesos de señalización intracelular y transporte de vesículas. Destacan las interacciones con la calpaína 3, caveolina-3, anexinas I y II, mitsugumina 53 (MG-53), tubulina o AHNAK (28, 53, 54). Algunos estudios han mostrado como en diversos modelos celulares deficitarios en estas proteínas, la disferlina no se localiza en la membrana celular, sino que queda atrapada en vesículas en el interior celular, sugiriendo que es preciso que la disferlina se encuentre en la membrana para poder llevar a cabo su función (55, 56).

#### **D. Disferlinopatías: patogénesis.**

La hipótesis más aceptada es que el elemento fundamental en la patogénesis de la disferlinopatía es un déficit en la reparación de la membrana muscular. La disrupción de la membrana muscular conlleva un incremento en los niveles de calcio intracelulares que puede entrar, bien de forma directa a través de las lesiones de la membrana, bien a través de canales iónicos no selectivos activados tras la lesión muscular (57-61).

Los niveles elevados de calcio activan proteasas calcio-dependientes, incluyendo entre otras a las calpaínas, que participan en la degradación de un gran número de proteínas de membrana contribuyendo a la destrucción de la fibra muscular (62, 63). El incremento en los niveles de calcio puede además producir una disfunción mitocondrial, bloqueando la obtención de energía por parte de la fibra muscular y participando en la degeneración de la fibra (64) (figura 10).





**Figura 10:** procesos de daño celular activados tras la lesión de la membrana muscular  
(Wallace & McNally, *Annual Reviews in Physiology*, 2009).

Por otra parte, el aumento en los niveles de calcio intracelular activa al mismo tiempo el proceso de reparación de la membrana. Es conocido que la función de muchas de las proteínas que participan en la reparación de la membrana precisan de calcio, entre ellas la propia disferlina. A diferencia de lo que ocurre con las mutaciones que afectan a las proteínas que dan soporte estructural a la membrana, el déficit de disferlina produce una disfunción en la capacidad de reparación de la membrana muscular, lo que induce de forma lenta un daño continuo sobre las fibras musculares.

Es posible que otros factores participen en la patogénesis de la enfermedad. La presencia de infiltrados inflamatorios en la biopsia muscular ha generado un gran número de investigaciones. Experimentos realizados en ratones con déficit de disferlina han mostrado un defecto importante en el proceso de regeneración muscular, caracterizado por la persistencia de fibras musculares necróticas y de infiltrados inflamatorios tras múltiples ciclos de lesión muscular con agentes citotóxicos (49, 65).

Se ha elucubrado sobre la presencia de un infiltrado inflamatorio. Se sabe que los neutrófilos expresan disferlina en la membrana celular y en las vesículas secretoras intracitoplasmáticas. Estas vesículas contienen productos citotóxicos como la elastasa y citoquinas que contribuyen al reclutamiento de los macrófagos (66). Se cree que el déficit de disferlina en los neutrófilos impediría la fusión de las vesículas intracitoplasmáticas con la membrana, con el consecuente déficit de secreción de los factores necesarios para que se produzca de forma correcta el proceso de fagocitosis de los restos necróticos musculares.

Además, se ha descrito un déficit en la colonización muscular por parte de los neutrófilos en el proceso de regeneración muscular en ratones disferlina negativos, lo que se ha correlacionado con el posible déficit en la secreción de moléculas quimiotácticas por parte de las fibras musculares lesionadas (49).

Como hemos comentado previamente los monocitos expresan disferlina. Diversos trabajos apuntan a que un déficit de la misma puede modificar su función, aumentando notablemente su capacidad fagocítica (67, 68). El hecho de que puedan detectarse macrófagos infiltrando el músculo esquelético de pacientes con un déficit de disferlina ha permitido hipotetizar sobre su participación en la fisiopatología de la enfermedad. No obstante, cabe destacar los últimos estudios realizados en un modelo murino que expresa disferlina de forma condicional únicamente en el músculo esquelético. En dicho modelo, no se ha detectado infiltración muscular alguna por células inflamatorias, sugiriendo que el elemento principal de la patogénesis de la enfermedad es precisamente el déficit de disferlina en fibras musculares y no así en células sanguíneas (69). Por otra parte se ha descrito que existe un aumento en la expresión de moléculas proinflamatorias en los músculos de los pacientes con déficit de disferlina, como por ejemplo TSP-1 con capacidad de activar la entrada de monocitos en el músculo

distrófico, o de moléculas con capacidad de activar la cascada de complemento y el depósito del complejo de ataque de membrana (69, 70).

### **E. Regeneración muscular:**

Se sabe desde hace más de un siglo que el músculo esquelético posee la capacidad de repararse o de generar nuevas fibras musculares después de un daño muscular agudo o en el proceso de una enfermedad crónica. Las fibras musculares son en realidad un sincitio celular que posee cientos de núcleos en un mismo citoplasma. En el año 1961, el investigador Alexander Mauro describió la existencia de células mononucleares situadas por fuera de la membrana de la fibra muscular pero por debajo de la lámina basal y las denominó célula satélite (SC) (71). Las SC son consideradas hoy en día el principal protagonista de la regeneración muscular. Estas células juegan un papel importante también en el crecimiento postnatal de las fibras musculares, que en adultos contienen de 6 a 8 veces más núcleos que en neonatos, siendo todos ellos irreversiblemente postmitóticos (72).

Además de las SC, se ha sugerido la existencia de otros progenitores situados por fuera de la lámina basal, incluyendo pericitos, células endoteliales y células intersticiales. Estas células han mostrado capacidad miogénica *in vitro* pero también *in vivo*, normalmente después de trasplantes celulares en modelos preclínicos animales murinos o caninos de distrofias musculares (73-75)

La mayoría de los estudios publicados hasta el momento actual sobre regeneración muscular han sido realizados en modelos murinos y no en humanos. Si bien existen muchas similitudes entre ambas especies, la generalización de los resultados obtenidos en los modelos animales debe realizarse con cautela. Pero, dado que desde un punto de vista ético no es posible realizar estudios secuenciales de destrucción muscular y

regeneración en humanos, el modelo murino es por fuerza el único en que basarnos para poder comprobar las hipótesis de trabajo necesarias (76). A pesar de ello, es necesario un comprobar en la medida de lo posible que los resultados obtenidos en animales, se cumplen también en el ser humano.

### ***Células satélite:***

La forma más exacta de identificar a las células satélite se basa en su localización anatómica: son aquellas células situadas por debajo de la lámina basal, pero por fuera de la membrana muscular(71). Los diferentes estudios publicados apuntan que representan entre un 2 y un 6% de todos los núcleos presentes en una fibra muscular(77).

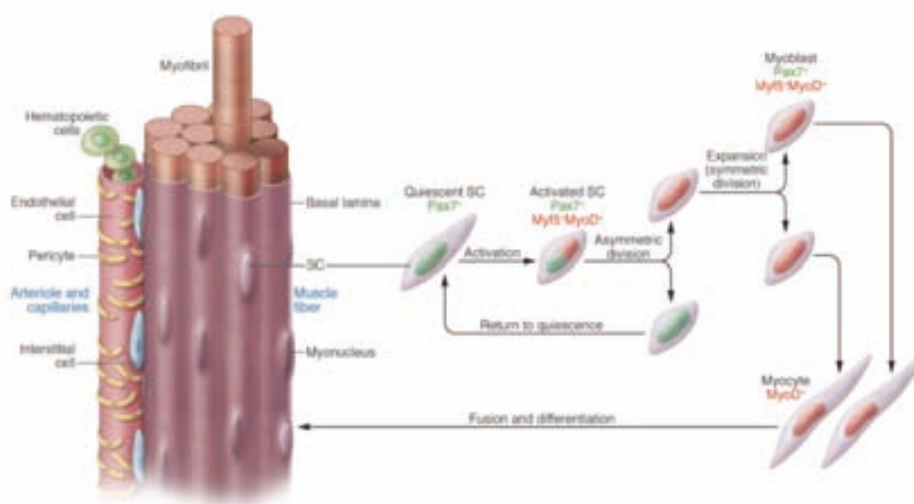
Las SC quiescentes expresan una serie de marcadores característicos, aunque no exclusivos (78). En ratones, los marcadores por excelencia de SC quiescente son Pax7 y Myf5 (79-81). En humanos, el marcador característico es NCAM, conocido también como CD56, aunque otros como c-met han sido usados con frecuencia (82).

Después de un daño muscular, las SC se activan y empiezan a proliferar (83, 84). En este estadio, son conocidas como células precursoras miogénicas o mioblastos.

Diferentes moléculas producidas, bien por las fibras musculares dañadas, bien por las células que infiltran el músculo tras un daño agudo pueden participar en la activación de la SC, destacando entre otros HGF, FGF, IGF o NO (85-88).

El proceso de diferenciación a músculo esquelético de las SC ha sido ampliamente estudiado tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios *in vitro* se realizan mediante cultivo de las SC obtenidas de biopsias musculares o a través de cultivo de fibras musculares aisladas. Tras su activación, las SC dejan de expresar Pax7, aumentan la expresión de Myf5 y empiezan a expresar MyoD. Esta primera fase se conoce como estado proliferativo, donde las SC aumentan en número. La expresión de miogenina y MRF4 marca el inicio del estado de diferenciación y al mismo tiempo el final de la

Los estudios *in vivo* se realizan mediante el seguimiento de los cambios que ocurren en los músculos de ratones dañados, bien con productos químicos (cardiotoxina) o físicamente (hielo local, corriente eléctrica, contracciones excéntricas). Todo el proceso de regeneración muscular tarda unos 21 días, período durante el que las SC pueden adquirir diferentes destinos. Algunas SC darán lugar a células Pax7+MyoD-, que regresarán a una posición periférica en la fibra muscular para mantener el pool de SC, mientras que las células Pax7+MyoD+ diferenciarán a músculo esquelético (89) (figura 11). Este tipo de división celular, en la que a partir de una célula inicial se obtienen dos células diferentes se conoce como división asimétrica y es característico de las células madre. En el músculo el factor de transcripción nuclear Notch regula este tipo de división celular (90).



(Tedesco et al , Journal of Clinical Investigation, 2010).

### ***Respuesta inflamatoria al daño muscular:***

Tras el daño muscular se inicia el proceso de regeneración muscular que incluye por un lado, la degradación y eliminación de las fibras musculares dañadas y, por otro lado la generación de nuevas fibras musculares. La inflamación que invariablemente sigue a un daño muscular agudo sigue una respuesta ordenada. Los neutrófilos son los primeros en invadir el músculo normalmente a partir de las dos horas desde la lesión muscular inicial. La población de neutrófilos aumenta progresivamente hasta las 24 horas, momento en el que descienden rápidamente y desaparecen (91). Los neutrófilos liberan radicales libres y diversas proteasas, como por ejemplo la elastasa, necesarios para degradar a las fibras musculares dañadas y la matriz extracelular, pero que por otra parte, pueden inducir un mayor daño muscular (92). Además, los neutrófilos secretan citoquinas pro-inflamatorias que favorecen la llegada y activación de macrófagos con actividad fagocítica. Si bien existe controversia, se cree que la pronta llegada de neutrófilos es un paso fundamental en la regeneración muscular, ya que en experimentos de lesión muscular realizados en animales neutropénicos se demuestra un aumento de los restos de fibras musculares degeneradas y una regeneración muscular más lenta (93, 94).

Posteriormente, macrófagos derivados directamente de monocitos originados en médula ósea y bazo, invaden el músculo convirtiéndose en la célula inflamatoria dominante a partir de las 24 horas (95). Estos primeros macrófagos conocidos como M1, tienen una actividad proinflamatoria con capacidad fagocítica, eliminando las fibras musculares necróticas. El reclutamiento de los macrófagos desde el músculo está mediado entre otros por las citoquinas proinflamatorias  $\text{TNF-}\alpha$  o interferón- $\gamma$  (96).

Después de esta primera fase claramente inflamatoria en la que se produce la degradación y fagocitosis de las fibras musculares dañadas, se inicia una segunda fase en la que la célula predominante es el macrófago M2 con actividad antiinflamatoria (97). No se conocen plenamente los factores que promueven el cambio de un estado proinflamatorio a uno antiinflamatorio. Sí se sabe en cambio, que la activación de los macrófagos M2 por IL-4 e IL-10 promueve la reparación tisular y la presencia de IL-13 produce una atenuación en la inflamación (98). El origen de estos macrófagos M2 es poco conocido, aunque se cree que pueden derivar de los macrófagos M1 que infiltraban el músculo (99).

Cabe destacar, que el momento de transición de un estado proinflamatorio a uno antiinflamatorio, coincide con la entrada de los mioblastos, en su fase final de diferenciación. El fenotipo M1 se observa durante la fase proliferativa, mientras que el fenotipo M2 se observa durante las fases de diferenciación temprana y tardía a músculo esquelético. Se ha sugerido que diferentes moléculas liberadas por los macrófagos podrían modular las diferentes fases de la miogénesis (95). En este sentido cuando los macrófagos M1 se co-cultivan con mioblastos se estimula la proliferación celular y se inhibe su diferenciación, mientras que cuando el co-cultivo contiene macrófagos M2 se produce un intenso estímulo pro-diferenciación (99).

Todos estos estudios se han realizado en modelos animales en los que se ha inducido un daño muscular agudo. Sabemos poco de lo que ocurre cuando el daño muscular es crónico y permanente, como en las distrofias musculares. Estudios en ratones *mdx* observaron un predominio de macrófagos M1 en las primeras fases de desarrollo de la enfermedad. Sin embargo eran los macrófagos M2 los que predominaban en fases más avanzadas de la enfermedad (100). Paradójicamente, es en esta última fase cuando se observa una regeneración muscular menos eficiente.

### ***Otros progenitores miogénicos:***

En los últimos quince años se ha demostrado capacidad miogénica en otras células diferentes a las SC. La existencia de precursores miogénicos se ha demostrado en células hematopoyéticas, en células madre mesodérmicas y en células originarias de ectodermo.

### **Células originarias hematopoyéticas:**

La primera evidencia de generación *in vivo* de músculo esquelético proveniente de células diferentes a las SC se remonta a 1998. El grupo liderado por Ferrari y colaboradores realizó un trasplante de médula ósea con células procedentes de un ratón C57/nLacZ en un ratón inmunosuprimido genéticamente Scid/bg. Posteriormente, tras la inyección intramuscular de cardiotoxina, los autores observaron fibras musculares regenerativas que contenían núcleos LacZ en su interior, signo inequívoco de que células procedentes de la médula ósea del donante habían sido capaces de llegar al músculo dañado y participar en la regeneración muscular(101). La existencia de precursores miogénicos en médula ósea se confirmó posteriormente en humanos. En el año 2002, el grupo de la Dra. Gussoni publicó la presencia de fibras musculares que expresaban distrofina en un paciente afecto de una distrofia muscular de Duchenne que había recibido en la primera infancia un trasplante de médula ósea de su padre (102). A pesar de estas demostraciones, los ensayos preclínicos realizados en ratones *mdx* con trasplante de médula ósea fracasaron, ya que pese a que existían algunas fibras musculares regenerativas que incorporaban material genético del donante, su número era muy reducido (menor al 0,5% del total de fibras) y no se produjo ningún cambio funcional significativo (103).



Precisamente fue en médula ósea donde se describió por primera vez la existencia de las células side-population (SP). La identificación se basaba en la capacidad de estas células de no teñirse con el marcador nuclear Hoechst-33333. Se sugirió que este grupo celular era el que tenía una mayor actividad como célula madre hematopoyética (104). Posteriormente se identificó un subgrupo de células SP que contenía los marcadores de superficie CD45 y Sca-1 y poseía capacidad miogénica *in vivo*, tras su trasplante en animales en los que se había realizado una lesión muscular previa (105). A pesar de esos resultados previos, el trasplante de estas células en ratones *mdx* fracasó, ya que apenas se encontraron fibras musculares que expresaban distrofina (alrededor de 0,1%) y no se produjo ningún cambio funcional en los animales tratados. La presencia de células SP ha sido descrita en múltiples tejidos incluyendo la piel, el corazón o el músculo esquelético (106). En el músculo esquelético, estas células, Sca1+ CD45+ se localizan alrededor de los vasos sanguíneos y son capaces de participar en la regeneración muscular cuando se inyectan en músculos de animales pre-tratados con cardiotoxina (107).

La capacidad miogénica se ha demostrado también en otra subpoblación de células circulantes originadas en médula ósea y que expresa el marcador CD133+. El grupo dirigido por el Dr. Torrente describió como estas células eran capaces de diferenciar a músculo esquelético cuando se inyectaban en ratones *mdx* deficientes en distrofina, mejorando funcionalmente a los animales tratados (108). Posteriormente, este mismo grupo demostró la presencia de células CD133+ residentes en músculo esquelético que exhibían todavía una mayor capacidad miogénica (109). Las células CD133+ procedentes de ratones *mdx*, podían además ser corregidas genéticamente mediante técnicas de *exón-skipping*, y ser reinyectadas en los propios ratones *mdx*, manteniendo su capacidad miogénica intacta (109).

### Células derivadas desde mesodermo:

Estas células se conocen también como células madre mesenquimales (MSCs). Descritas en 1974 por el Dr. Friedenstein como una población celular originada en médula ósea, adherente al plástico que formaba colonias de células. Su primera denominación fue la de fibroblastos formadores de colonias (CFU-f) (110). Esta población celular era capaz de diferenciar *in vitro* a diferentes tipos de células mesenquimales incluyendo adipocitos, condrocitos y osteoblastos. En los últimos años múltiples tipos de MSCs se han aislado desde diversos tejidos, incluyendo médula ósea, piel o músculo esquelético. Su capacidad de diferenciación, la nomenclatura aplicada a cada una de estas células y los marcadores que cada una de ellas expresa es diferente, lo que ha contribuido a generar una situación de confusión general respecto a qué son en realidad las MSCs. Por este motivo, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ha consensuado una serie de características que las MSCs deben cumplir para ser consideradas como tales (111):

1. Han de ser adherentes al plástico cuando se cultivan en placas convencionales.
2. Deben expresar CD105, CD73 y CD90 y no expresar CD45, CD34, CD14, CD11, CD78 $\alpha$ , CD19 y el HLA-II.
3. Deben ser capaces de diferenciar a osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo condiciones estándar de cultivo.

A pesar de la falta de consenso en lo referente a su definición, el campo de las MSCs se ha desarrollado notablemente en los últimos años, debido a las aplicaciones prácticas que tienen este tipo de células madre. Las MSCs son un candidato atractivo para la terapia celular y la regeneración tisular, ya que además de su conocida capacidad de

generar tejidos conectivos, tienen capacidad de diferenciación hacia líneas cardiogénicas y miogénicas. A pesar de todo, existe mucha controversia sobre la capacidad real de estas células de participar *in vivo* en la regeneración tisular, ya que la mayoría de los resultados proceden de estudios realizados *in vitro*. Por otra parte, no es posible realizar experimentos en humanos para poder seguir a células marcadas genéticamente a lo largo de su ciclo y ver si en realidad, abandonan su situación originaria para generar otros tejidos mesodérmicos, especialmente músculo.

De hecho, en la mayoría de los casos, se cree que el beneficio de los trasplantes de estas células se produce por la secreción paracrina de factores tróficos, más que por su contribución directa en la regeneración tisular.

Se han descrito diferentes MSCs residentes en el músculo. Un primer tipo de células fue obtenido mediante técnicas de cultivo selectivo en las que se seleccionaban células pobremente adherentes a la placa de cultivo, eliminando las muy adheridas y las que flotaban. Estas células, conocidas como células madre derivadas de músculo, no sólo eran capaces de diferenciar a líneas mesodérmicas sino que además podían recuperar la médula ósea cuando eran trasplantadas en animales irradiados y generar fibras musculares cuando se inyectaban en músculos dañados (112). Posteriormente, Zheng y colaboradores describieron otro tipo celular aislado mediante *sorting* que era positivo por los marcadores CD34, CD56 y CD144 (113). Estas células se denominaron mioendoteliales y residían de forma próxima a los vasos sanguíneos. Además de generar las tres líneas mesodérmicas clásicas, eran capaces de producir precursores miogénicos y endoteliales. Estas células perivasculares se pueden identificar en diversos tejidos del organismo y mantienen su capacidad como célula madre mesodérmica, exhibiendo una notable capacidad miogénica independientemente del tejido del que provengan(114).

Algunos autores han sugerido que estas células podrían ser en realidad pericitos ya que expresan marcadores que les son característicos como NG2, PDGF-R $\alpha$  o CD146(115).

Una de las MSCs más conocidas son las derivadas de tejido graso, conocidas como adipose derived stem cells o ADSC. Estas células pueden aislarse con relativa facilidad desde la grasa subcutánea(116). Se ha demostrado su capacidad de diferenciación a músculo esquelético tanto *in vitro*, mediante técnicas de co-cultivo, como *in vivo* tras su inyección intramuscular o sistémica a modelos preclínicos de diversas distrofias musculares(117, 118).

Finalmente, destaca con especial interés un tipo celular conocido como mesoangioblasto, descrito a finales de los años 90 por el grupo del Dr. Cossu en Milán, que también puede localizarse en biopsias musculares en una localización perivascular. Dado que parte de la investigación llevada a cabo en esta tesis se centra en este tipo celular, le dedico un apartado propio.

Son diversos los autores que abogan por la importancia del espacio perivascular como nicho adecuado para células madre(119). En este sentido, se ha demostrado que las células satélite no se distribuyen en las fibras musculares de forma arbitraria. En un músculo sano, hasta el 88% de las mismas están localizadas a menos de 20 micrómetros de los capilares. En el músculo humano regenerante, más de 80% de las células satélite que han entrado en fase de proliferación, se encuentran íntimamente relacionadas con los capilares (120). Por otra parte, en el espacio perivascular existen abundantes células con potencial miogénico (MABs, SP cells, PW1 cells) pero también precursores de fibroblastos o adipocitos (121).

## **F. Mesoangioblastos**

Los mesoangioblastos (MABs) son un tipo de célula madre mesenquimal descubiertos por el grupo dirigido por el Dr. Cossu a finales de los años 90 (122). Estos primeros MABs se denominaron embrionarios (descritos aquí como eMABs) al proceder de la pared dorsal de aortas embrionarias de ratones y codornices. En los primeros trabajos, se trasplantaron fragmentos de estas aortas en embriones de pollo demostrándose la participación de células procedentes de los animales donantes en diversos tejidos, incluyendo vasos sanguíneos, hueso, cartílago, músculo liso, músculo esquelético y cardíaco. Mediante técnicas de cultivo limitante, en las que una única célula se multiplica en un pocillo de cultivo, se clonó una población celular homogénea que no mostraba signos de senescencia tras múltiples divisiones celulares. El crecimiento celular se detenía por contacto cuando se alcanzaba la confluencia, sin que existiese capacidad tumorigénica cuando se inyectaban en animales *nude* (123). Los eMABs expresaban marcadores de origen hematopoyético y endotelial (CD34, Flk1, Pax3, Sca-1, VE-Caderina o MEF-2C) pero no marcadores de origen miogénico (MyoD/Myf5). Los estudios de expresión génica mostraron que producían genes típicos de tejidos mesodérmicos, muchos de los cuales, eran receptores de diversas moléculas relacionadas con la diferenciación mesodérmica, como el receptor de BMP-4, Wnt o Notch. En relación con este hallazgo, los eMABs eran capaces de diferenciar *in vitro* a diversos tejidos de origen mesodérmico cuando eran cultivados en medios específicos. El nombre mesoangioblastos se propuso dada su capacidad de generar tejidos mesodérmicos y vasos sanguíneos (meso-angioblastos).

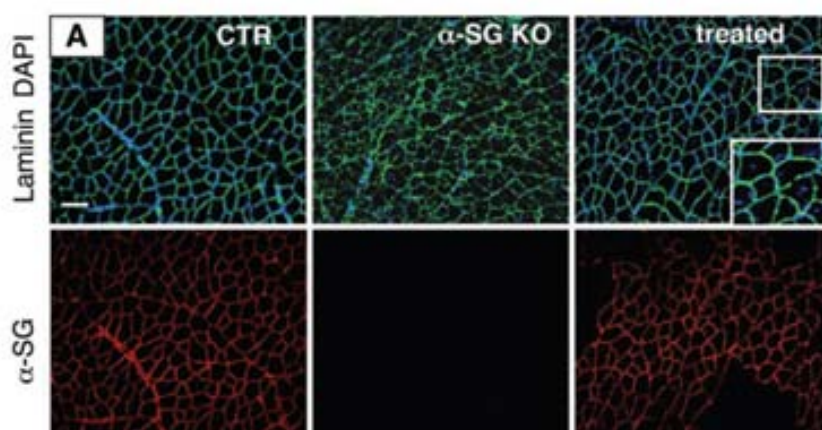
Cuando estas células se inyectaban por vía intra-arterial, eran capaces de atravesar la pared capilar, siempre y cuando, el endotelio de los vasos expresase señales de inflamación tisular como ocurre, por ejemplo, en las distrofias musculares (124). De

hecho, los MABs poseen receptores para diversas citoquinas, siendo capaces de migrar tanto *in vitro* como *in vivo* en respuesta a HMGB-1, una molécula nuclear que se libera por células necróticas y que actúa como una potente citocina pro-inflamatoria (125).

Dado que HMGB-1 se producía de forma importante en las fibras musculares del modelo murino de LGMD-2D (déficit de alfa-sarcoglicano), se planteó la posibilidad de realizar un trasplante celular mediante inyección intra-arterial de eMABs en dicho modelo (123). Con la intención de poder identificar con facilidad a las células inyectadas, éstas fueron infectadas con un vector lentiviral que expresaba LacZ nuclear (nLacZ). Veinticuatro horas después de la inyección de eMABs wild-type en la arteria femoral de ratones deficientes en alfa-sarcoglicano, se encontraron abundantes células en la matriz extracelular de todos los músculos situados de forma distal al punto de inyección. Dos semanas después de la inyección se hallaron abundantes fibras musculares que poseían en su interior núcleos LacZ positivos, demostrando la capacidad de diferenciación miogénica de los eMABs *in vivo*. No obstante, células nLacZ positivas se hallaron también en la periferia de las fibras pero por debajo de la membrana basal, en una posición característica de célula satélite muscular y expresando marcadores característicos de las mismas, como M-cadherina o c-Met. Asimismo, células nLacZ positivas se encontraron en la pared de los vasos sanguíneos, expresando marcadores característicos de pericitos o de músculo liso, como la actina de músculo liso (SMA). Estos resultados sugieren que una vez en el músculo las células son capaces de diferenciar a diferentes tejidos mesodérmicos (músculo liso y esquelético), pero además tienen capacidad de regenerar el pool de células satélite.

A su capacidad regenerativa miogénica, debía sumarse el aporte de un material genético normal, que contenía por tanto el gen del  $\alpha$ -sarcoglicano deficitario en este modelo animal. Tras dos meses de la inyección celular, se demostró una recuperación parcial de

la expresión de alfa-sarcoglicano en los músculos de ratones enfermos (figura 12). La recuperación en la expresión de la proteína deficitaria se acompañó de un cambio en la evolución morfológica de la enfermedad, ya que se detectaron un mayor número de fibras musculares normales, un menor número de fibras necróticas y una menor área de fibrosis muscular a los seis meses del trasplante. Existieron también diferencias funcionales: se demostró una mejoría en la fuerza y en la velocidad de acortamiento de fibras musculares aisladas de los ratones tratados. Por otra parte, los animales realizaban de una forma más eficiente los ejercicios físicos a los que eran sometidos (rotarod y treadmill) respecto a los ratones no tratados.



**Figura 12:** Estudio con inmunofluorescencia de la expresión de  $\alpha$ -sarcoglicano en ratones afectados por una distrofia muscular 2D tratados con eMABs. CTR: control sano.  $\alpha$ -SG KO: ratón con déficit de  $\alpha$ -sarcoglicano no tratado con eMABs. Treated: ratón con déficit de  $\alpha$ -sarcoglicano transplantado con eMABs.

*(Sampaolesi et al, Science 2003).*

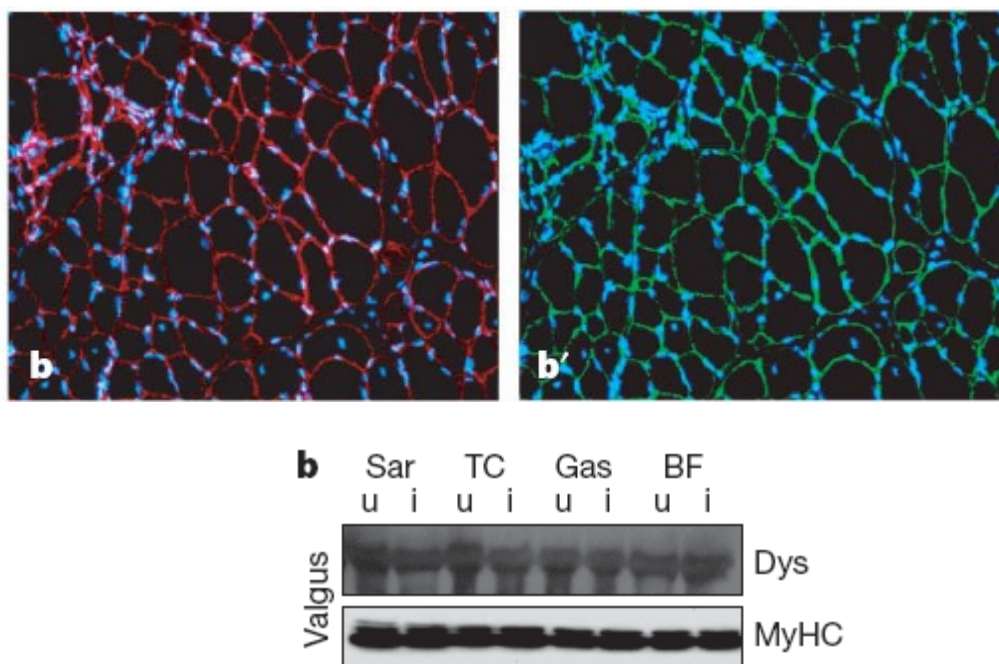
Dado que plantear un tratamiento en pacientes afectados de distrofias musculares a partir de un trasplante de MABs obtenidos a partir de un tejido embrionario no es aceptable, los esfuerzos se centraron en la obtención de MABs procedentes de tejidos adultos. En el año 2006 se obtuvieron MABs procedentes de biopsias musculares de perros jóvenes

(de aquí en adelante cMABs), de unos 15 días de edad mediante cultivo limitante(73). Las células mostraban una morfología similar los MABs embrionarios, de forma triangular o alargada, proliferaban en medios de cultivo convencionales alcanzando la senescencia después de 25 pases y expresaban diferentes marcadores de superficie entre los que destacaba CD44 y CD13, pero no marcadores endoteliales (CD31) ni hematopoyéticos (CD45 o CD34). Estas células diferenciaban a músculo esquelético y producían miotubos mixtos cuando se co-cultivaban con células C2C12 o cuando se transfectaban con MyoD.

Se trasplantaron cMABs *wild-type* por vía intrarterial sistémica a tres perros Golden Retriever afectados de una distrofia muscular por déficit de distrofina en cinco inyecciones consecutivas mensuales. Clínicamente los perros mantuvieron un buen nivel de deambulación durante los primeros dos meses. A partir de ese momento el resultado fue dispar, si bien uno de los animales se mantuvo sin cambios hasta los trece meses, otro de los animales se deterioró progresivamente y el tercero, murió de forma repentina por una miocarditis. No obstante, los estudios morfológicos realizados en las biopsias musculares de los animales revelaron una morfología muscular bien preservada, aunque se detectaron zonas de necrosis y fibrosis muscular. Desde un 10 hasta un 70% de las fibras musculares expresaban la proteína distrofina en su superficie (figura 13).

Mediante Western-Blot de diferentes músculos, se confirmó que la expresión de distrofina era variable, desde indetectable, hasta un 60% de expresión comparada con muestras procedentes de controles de la misma edad. Los cambios morfológicos identificados se tradujeron en una mejoría funcional de los animales. La fuerza que diversos músculos de los animales tratados eran capaces de ejercer se mantuvo durante los meses que duró el tratamiento, mientras que la de los controles decrecía de forma progresiva.





**Figura 13:** recuperación de la expresión de distrofina de perros GRMD transplantados con cMABs demostrada mediante inmunofluorescencia (b: distrofina, b': laminina) y confirmada mediante Western-Blot.

*(Sampaolesi, Nature 2006)*

Asimismo, la fuerza tetánica de contracción de fibras musculares aisladas fue mayor en los animales tratados que en los controles no tratados, existiendo una correlación entre la expresión de distrofina en la fibra y la fuerza de contracción obtenida (73).

Posteriormente, en el año 2007, se obtuvieron por primera vez MABs procedentes de biopsias musculares humanas de controles sanos de edad variable, desde 15 hasta 78 años de edad (126) mediante técnicas de cultivo limitante. A partir de la biopsia muscular se obtuvieron clones de células con morfología triangular similar a la de los MABs caninos o embrionarios murinos. Habitualmente, se obtienen unas 10.000 células por biopsia muscular.

Estas células poseen una serie de características que las distingue de los MABs descritos previamente. En primer lugar, entran rápidamente en senescencia si se cultivan en medios convencionales de cultivo. En segundo lugar, al igual que las células de origen canino y a diferencia de las células de origen embrionario, tienen una limitada capacidad de reproducción, llegando a un máximo de 20 divisiones, momento en el que se detecta una reducción notable de la longitud de los telómeros, característica habitual de las células senescentes. En ese momento, las células adaptan una morfología plana y alargada. En tercer lugar, expresan marcadores típicos de pericitos, como desmina, SMA, vimentina, PDGF-Rc $\beta$ , fosfatasa alcalina o NG2, pero no expresan marcadores de células endoteliales (CD-31, CD34), de células satélite (NCAM, M-caderina) u otros marcadores miogénicos (MyOD, Myf5 o Pax7) a excepción de Pax3. Los estudios de citometría demostraron la expresión de marcadores de superficie como CD44 y CD13 en más de un 90% de las células, y en menor medida, otros marcadores como CD146, CD63 o CD90. La expresión de fosfatasa alcalina por parte de las células permite su obtención con facilidad desde el tejido muscular a través de técnicas de sorting. De hecho, hasta un 3% de las células obtenidas de la disgregación de una biopsia muscular fresca son positivas para fosfatasa alcalina (AP) y negativas para CD56 (lo que asegura que no se trata de células satélite). Esta población AP+/CD56- es capaz de diferenciar a diferentes tejidos de origen mesodérmico cuando se cultiva en medios especialmente enriquecidos en citocinas activadoras de cada una de las vías de diferenciación. A diferencia de otras células, los MABs humanos diferencian de forma espontánea a músculo esquelético cuando se cultivan en placas tratadas previamente con Matrigel. El índice de diferenciación a músculo esquelético es variable, pudiendo participar en la formación de miotubos *in vitro* desde un 40 hasta un 70% de las células.

Los estudios inmunohistoquímicos realizados en biopsias musculares mostraron como las células AP<sup>+</sup> se localizaban alrededor de los vasos sanguíneos en íntima relación con las células endoteliales positivas por CD31, en una posición característica de las células periendoteliales.

Estas células tienen capacidad miogénica también *in vivo*. Tras su inyección por vía intra-arterial en un modelo murino deficitario en distrofina (ratones *mdx*), los MABs humanos fueron capaces de atravesar el endotelio de los vasos sanguíneos, colonizar el músculo circundante y fusionarse con las fibras musculares, siendo posible detectar distrofina humana en un importante número de fibras. La expresión de la proteína se acompañó de una mejoría funcional de los animales trasplantados cuando fueron sometidos a pruebas de esfuerzo físico (treadmill o rotarod).

Dados estos resultados, se está realizando en el momento actual un ensayo clínico en fase II en pacientes afectos de una distrofia muscular de Duchenne con trasplante heterólogo de MABs procedentes de un donante emparentado. Los resultados de este estudio se conocerán en 2013.

Ya que todo parecía indicar que los MABs son un subgrupo de pericitos y visto que tenían una alta capacidad de miogénesis *in vivo* y que además poseían capacidad para regenerar el pool de células satélite, se hipotetizó con la posibilidad de que los pericitos participasen en el proceso de regeneración muscular que se produce tras una lesión muscular aguda o en las distrofias musculares. En este sentido, Dellavalle y colaboradores, exploraron la capacidad miogénica *in vivo* de los pericitos en ratones transgénicos que expresaban la fosfatasa alcalina (AP) unida al marcador LacZ (127). En músculos murinos, la AP se expresa tanto en células endoteliales como en pericitos. En un primer grupo de experimentos se demostró que sólo los pericitos AP<sup>+</sup> eran capaces de diferenciar a músculo esquelético y no así las células endoteliales AP<sup>+</sup>. En

segundo lugar se pudo comprobar la existencia de fibras musculares LacZ positivas tras la inducción de daño muscular agudo (mediante cardiotoxina) o cuando estos ratones transgénicos se cruzaban con modelos murinos de distrofia muscular, como el ratón deficiente en alfa-sarcoglicano. Estos datos sugerían que los pericitos podían participar en el proceso de regeneración muscular en el ratón, sin que este dato haya sido confirmado hasta la fecha en humanos.

#### **G. Terapia celular en distrofias musculares: experiencia en humanos.**

Se define terapia celular como aquella técnica en la que se pretende substituir un tejido enfermo por otro sano a través del trasplante de células de un donante libre de enfermedad o bien de células del propio paciente que han sido corregidas genéticamente. El ejemplo más común sería el trasplante de médula ósea que puede realizarse en muchas enfermedades hematológicas.

En el caso de las distrofias musculares, la terapia celular conlleva una serie de dificultades añadidas. El músculo esquelético es el tejido más abundante del cuerpo. Su unidad básica es la fibra muscular, un sincitio celular que contienen cientos o miles de núcleos todos ellos invariablemente postmitóticos. En general, en las distrofias musculares se afectan todos los músculos del cuerpo, por lo que la terapia que se plantee ha de ser capaz de substituir gran parte del músculo enfermo. El modelo celular óptimo debe reunir una serie de requisitos (128):

1. Se debe poder obtener fácilmente de biopsias de un adulto.
2. Se debe poder expandir con facilidad *in vitro*.
3. Debe tener una alta capacidad de diferenciación a músculo esquelético.
4. No debe tener ninguna capacidad tumorigénica una vez inyectado.

5. Se debe poder manipular genéticamente de forma sencilla, para poder plantear estudios de trasplante autólogo con célula corregidas.
6. Debe poder inyectarse por vía sistémica, habiendo demostrado su capacidad para atravesar la pared de los vasos sanguíneos y para colonizar el músculo enfermo.

Dado que las SC son consideradas el precursor muscular fundamental y ya que son fácilmente obtenibles desde biopsias musculares, se pensó que un trasplante de las mismas en pacientes afectados de distrofias musculares podría representar una terapia óptima. En 1990, el Dr. Law y colaboradores, publicaron los resultados del primer trasplante de mioblastos en un paciente de 9 años de edad afecto de una distrofia muscular de Duchenne. Las células se habían obtenido de su padre y se habían expandido hasta alcanzar los ocho millones. El paciente recibió de forma concomitante una única inyección intramuscular en el *extensor digitorum brevis (EDB)* y ciclosporina por vía oral para evitar el rechazo celular. A los 92 días del trasplante, se realizó una biopsia muscular del EDB demostrándose mediante IHQ, la presencia de fibras distrofina positivas y, mediante WB, la aparición de una banda que correspondía a la distrofina. Dado el éxito de este primer trasplante, en los años sucesivos se publicaron un total de 11 ensayos clínicos con trasplante de mioblastos (figura 14).

En todos los casos, la inyección celular se realizaba de forma directa intramuscular. Si bien los resultados iniciales eran esperanzadores, por la detección de distrofina mediante IHQ o WB y por una ligera mejoría clínica de los pacientes en pruebas de esfuerzo físico, los últimos ensayos realizados con mayor número de pacientes fueron negativos, demostrando que las fibras distrofina positivas eran pocas y no producían cambio funcional alguno. Por este motivo, la terapia con mioblastos fue prácticamente abandonada.

**Table 3**

Clinical trials of myoblast transplantation in DMD patients

| Author   | Year | Blind | Number of pts  | Pt age | Drugs administered | Number of myoblasts ( $\times 10^6$ ) | Expression of dystrophin                                                  | Improved strength             | Ref |
|----------|------|-------|----------------|--------|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----|
| Law      | 1991 | No    | 3              | 9–10   | Cyclosporine       | 8                                     | 3/3 by IHC and WB at 3 months                                             | 3/3 patients at 3 months      | 95  |
| Huard    | 1992 | No    | 4              | 13–20  | None               | 25                                    | 3/4 by IHC and WB at 4 months (up to 80% fibers positive)                 | 3/4 patients                  | 96  |
| Law      | 1992 | No    | 21             | 6–14   | Cyclosporine       | 5000                                  | Not evaluated                                                             | 43% muscles examined improved | 98  |
| Gussoni  | 1992 | Yes   | 8              | 6–10   | None               | 100                                   | 3/8 by PCR at 1 month                                                     | Not evaluated                 | 99  |
| Karpati  | 1993 | Yes   | 8              | 6–10   | Cyclophosphamide   | 55                                    | 0/8 by IHC at 1-year follow-up                                            | 3/8                           | 97  |
| Tremblay | 1993 | Yes   | 5              | 4–9    | None               | 100–240                               | 3/4 by IHC at 1 month (up to 36% fibers positive); 1/4 by IHC at 6 months | 0/5                           | 100 |
| Morandi  | 1995 | Yes   | 3              | 6–9    | Cyclosporine       | 55                                    | 0/3 by IHC or PCR                                                         | Not evaluated                 | 101 |
| Mendell  | 1995 | Yes   | 12             | 5–9    | Cyclosporine       | 110                                   | 1/12 by IHC <sup>a</sup>                                                  | 0/12                          | 102 |
| Müller   | 1997 | Yes   | 10             | 5–10   | Cyclosporine       | 100                                   | 3/10 by PCR at 1 month; 1/10 at 6 months                                  | 0/10                          | 103 |
| Neumeyer | 1998 | Yes   | 6 <sup>b</sup> | >21    | Cyclosporine       | 73–100                                | 0/3, by IHC <sup>c</sup>                                                  | 0/3                           | 94  |
| Skuk     | 2006 | Yes   | 9              | 8–17   | Tacrolimus         | 30                                    | 8/9 patients by IHC <sup>c</sup><br>3.5%–26% fibers expressed dystrophin  | Not evaluated                 | 104 |

Pt, patient; IHC, immunohistochemistry; WB, Western blot. <sup>a</sup>Multiple injection site protocol. <sup>b</sup>Study performed with Becker muscular dystrophy patients. <sup>c</sup>IHC was performed using a peptide-specific antibody recognizing only donor dystrophin.

**Figura 14:** Ensayos clínicos realizados con trasplante de mioblastos en pacientes afectados de una distrofinopatía (*Tedesco et al, Journal of clinical investigation 2010*).

Las ventajas de los mioblastos como modelo de célula madre son su fácil obtención desde biopsias musculares, su rápido crecimiento *in vitro*, su alta capacidad de diferenciación a músculo esquelético y el hecho de que estas células pueden manipularse genéticamente con facilidad, permitiendo trasplantes autólogos en pacientes afectados de una distrofia muscular. De entre los inconvenientes destaca que estas células son incapaces de atravesar la pared de los vasos sanguíneos cuando se inyectan por vía sistémica, siendo por tanto de inyección intramuscular obligada. Asociado a este problema está el hecho de que las células apenas son capaces de penetrar en el músculo una vez inyectadas, permaneciendo cercanas al punto de inyección. Eso implica que para poder tratar de forma adecuada un músculo determinado, son necesarias miles de inyecciones que cubran cada milímetro cuadrado de tejido. El otro gran inconveniente de los mioblastos es que la mayoría muere dentro

de las primeras 72 horas de la inyección, habiéndose relacionado con este proceso el hecho de que las células pasan de estar en un ambiente idóneo para el crecimiento (cultivo con factores de crecimiento), a estar en un músculo con alto contenido en tejido fibroso y graso y con baja concentración de nutrientes y de oxígeno. Se ha postulado que otros factores pueden participar en la muerte precoz de los mioblastos trasplantados, como la existencia de una respuesta inmune contra las células que se ha descrito incluso en casos de máxima compatibilidad de HLA.

A pesar de que se han descrito múltiples hipotéticos precursores miogénicos diferentes, los ensayos realizados en humanos con estas células diferentes a las SC son escasos.

Dados los resultados esperanzadores obtenidos con las células CD133 positivas, se realizó un ensayo clínico en pacientes DMD consistente en un autotrasplante de estas células las mismas obtenidas desde biopsias musculares, mediante inyección intramuscular directa en el *Adductor digitorum brevis*. No se observaron efectos secundarios relevantes, si bien no se produjo ninguna modificación en el balance muscular de los pacientes (129).

Como he mencionado previamente, el grupo del Dr. Cossu está en este momento realizando un ensayo clínico con trasplante heterólogo de MABs humanos en niños con una distrofia muscular de Duchenne mediante inyección sistémica por vía intraarterial. Los resultados del estudio se harán públicos durante el año 2013.

#### **H. Modelos animales de disferlinopatía: descripción y terapias aplicadas.**

Los principales modelos animales de la enfermedad son los ratones de las cepas SJL/J y A/J (130, 131).

El modelo SJL tiene una mutación heredada de forma autosómica recesiva que afecta a una posición de *splicing* y que produce una pérdida de parte del dominio C2E que se

encuentra altamente conservado en todas las proteínas de la familia ferlina (130). Este cambio produce una expresión reducida de disferlina de apenas el 15% respecto a los controles. Este modelo es susceptible a diversas enfermedades autoinmunes inducidas, como la encefalitis experimental autoinmune o una miositis inflamatoria. En este modelo los primeros cambios distróficos se detectan a las tres semanas de vida, y progresan durante los primeros meses, de modo que a los 7 meses se puede detectar fibrosis, infiltración grasa, focos inflamatorios y una variabilidad aumentada del tamaño de las fibras, con abundantes fibras necróticas y regenerantes (132). Se afecta la musculatura proximal de las extremidades inferiores en mayor medida que la distal. Estos cambios histológicos suponen una alteración funcional en los animales, ya detectable a las tres semanas de vida pero que se hace más evidente a partir de los seis meses.

El modelo A/J posee una inserción de un retrotrasposón cerca del extremo 5' (131). En ambos casos no se detecta disferlina en ningún tejido. Este modelo se caracteriza por un inicio tardío de la enfermedad, pudiendo detectarse los primeros cambios distróficos a partir de los 5 meses de edad afectando de forma predominante a la musculatura proximal de las extremidades inferiores y al diafragma (132). Se ha descrito, igual que en la cepa SJL, abundantes infiltrados inflamatorios en las biopsias musculares. Funcionalmente los ratones A/J no tienen grandes problemas hasta fases avanzadas de la vida, sin que desarrollen en ningún momento una discapacidad destacable. Se ha descrito la presencia de cardiopatía en estos animales. Recientemente la cepa A/J se ha cruzado con la cepa C57/BL6 obteniéndose ratones con fondo genético C57/BL6 pero portadores de la mutación A/J y con ausencia de disferlina en tejido. Se les ha denominado B6.1/J-*Dysf*<sup>prmd</sup>. Estos ratones no muestran diferencias fenotípicas destacables respecto al modelo A/J (133).



Se han realizado diferentes ensayos preclínicos en modelos murinos de disferlinopatía bien con células madre de diferente origen (terapias celular), bien a través de manipulación genética (terapia génica):

#### Terapia celular:

En el año 2002 el grupo del Dr. Tremblay publicó los resultados del trasplante de mioblastos murinos procedentes de un ratón transgénico TnI-LacZ1/29 que expresa niveles normales de disferlina y contiene el gen LacZ bajo el control del promotor de la troponina I rápida, expresando B-galactosidasa en plasma en miotubos y fibras musculares (134). Se inyectaron 2 millones de mioblastos mediante inyección intramuscular en el tibial anterior (TA) de 8 ratones SJL/J de 2 meses de edad junto a notexina para aumentar el daño muscular. Los ratones habían sido irradiados (20 Gy) una semana antes del trasplante para bloquear la proliferación de las células satélite del músculo y fueron tratados con FK-506 para evitar el rechazo de las células. Al mes de la inyección, los estudios estructurales demostraron que entre un 20 y un 30% de las fibras musculares del TA expresaban disferlina. Todas las fibras disferlina positivas eran asimismo B-galactosidasa positivas. La expresión de disferlina se comprobó mediante WB. No se hicieron estudios funcionales en los ratones ni se comprobó si la inyección de las células modificaba las alteraciones histológicas propias de la distrofia muscular a largo plazo.

En el año 2004 el grupo del Dr. Brown publicó el resultado del trasplante de células obtenidas de cordón umbilical humano en el modelo murino SJL/J (135). Este estudio se basaba en los trabajos previos publicados, reportando la obtención de células mesenquimales desde el cordón umbilical y en su capacidad de diferenciación a músculo esquelético *in vitro*. Se utilizaron tres tipos celulares distintos para el estudio:

(A) todas las células obtenidas desde el cordón umbilical humanas, (B) un subgrupo de células CD34+ humanas y (C) células esplénicas procedentes de una ratón SCID irradiadas. En cada uno de los grupos se inyectó un millón de células por vía endovenosa en 8 ratones SJL/J de 6 semanas de edad que fueron tratados con FK-506 durante todo el procedimiento. Se sacrificaron los animales a las 1, 4, 8 y 12 semanas del trasplante. Se analizaron los músculos gemelos y cuádriceps de los animales, detectándose células humanas en los grupos A y B en todos los puntos de corte. Menos de un 1% de las fibras musculares expresaba disferlina en los grupos A o B a las doce semanas. Estas fibras expresaban asimismo distrofina humana, asegurando de este modo que la expresión de disferlina procedía de la fusión de una célula humana y no que se trataba de una fibra rebertante. Por otra parte, se detectaron células humanas tanto en riñón como en el hígado de los animales. No se detectó infiltrado inflamatorio en los músculos estudiados, sugiriendo que el rechazo celular no explicaba los bajos resultados obtenidos. Los autores discuten en el trabajo el hecho de que, si bien es cierto que queda demostrada la capacidad miogénica de estas células una vez inyectadas por vía sistémica, el porcentaje de fibras musculares disferlina positiva era tan baja que apenas sí podía significar un cambio clínico considerable.

El grupo de la Dra. Zatz publicó en el año 2008 los resultados de un trasplante de células madres mesenquimales derivadas desde tejido graso humano (118). Como modelo animal se usaron ratones SJL/J de dos meses de edad. Los animales recibían inyecciones endovenosas de un millón de células semanales durante el primer mes y después mensuales durante los siguientes seis meses. Se detectó la presencia de DNA humano en músculos proximales y distales de todos los animales, así como en el pulmón, hígado y riñón. En los músculos estudiados se detectó una expresión de disferlina de entre un 14 y un 26% usando real-time PCR. Mediante IF se detectó que

hasta un 50% de las fibras musculares expresaban distrofina humana. No se detectó reacción inflamatoria en los músculos analizados. Los estudios funcionales realizados en estos animales detectaron una mejoría considerable en los tests motores comparando animales tratados con aquellos no tratados e incluso en los animales tratados pre y postinyección celular.

#### Terapia génica:

Uno de los problemas fundamentales que debe afrontar la terapia génica en el caso de la disferlinopatía es el gran tamaño del gen *DYSF* que hace inviable el uso de vectores virales como portadores de un gen sano. Las publicaciones que han afrontado este problema hasta el momento lo han hecho desde dos perspectivas diferentes: el uso de minidisferlinas y la aplicación de una técnica que permite introducir un gen entero dividido en dos trozos, la concatemerización.

El grupo del Dr. Lévy publicó en el 2010 los resultados procedentes del tratamiento de ratones BLA/J en los que se había transducido una minidisferlina usando un vector adeno-virus asociado (136). Este estudio se basó en la detección de una paciente diagnosticada de una distrofia muscular por déficit de disferlina, en la que se había demostrado una gran delección que abarcaba desde el exon 2 al exon 40, pero que estaba *in-frame*, respetando el marco de lectura y permitiendo la transcripción de la proteína.

La minidisferlina resultante contenía tan sólo el extremo N-terminal, los dos últimos dominios C2, el dominio transmembrana y el extremo C terminal. La transfección en fibroblastos de un constructo conteniendo la disferlina mutada de la paciente permitió identificar a la proteína en la membrana celular. Se construyeron entonces vectores rAAV que contenían la minidisferlina, inyectándose los virus de forma intramuscular en el TA de ratones BLA/J de 1,5 y 3 meses de edad. Un mes después de la inyección se

demostró la expresión de la minidisferlina en el sarcolema de las fibras musculares (si bien no se especifica en el trabajo que porcentaje de fibras expresaban la proteína). Estudios funcionales de reparación de fibras musculares aisladas dañadas con láser, demostraron que la midisferlina era completamente funcionante.

El mismo año, el grupo de la Dra. Richard publica una nueva técnica para introducir el gen DYSF humano de forma completa en el interior de las células conocido como concatemerización (133). En esta técnica se usan dos AAV diferentes, uno de ellos transporta el extremo 5' del cDNA con una secuencia intrónica que contiene un secuencia donante de splicing, mientras que el otro AAV transporta el cDNA con extremo 3' y una secuencia intrónica con un receptor de splicing, permitiendo que una vez dentro de las células diana, ambas secuencias puedan unirse. En el caso de la disferlina, se dividió la secuencia codificante en dos porciones (exones 1-28 y exones 29 a 55). Los primeros ensayos se realizaron mediante inyección intramuscular en el TA de ratones B6.1/J-*Dysf*<sup>prmd</sup> de 2 meses de edad. Los estudios histológicos mostraron la expresión de disferlina en la membrana de las fibras musculares y en el retículo sarcoplásmico en los túbulos T, confirmada mediante WB, alcanzado una expresión máxima del 59% a los dos meses de la inyección. Se observaron cambios histológicos en los músculos estudiados, evidenciándose una mejoría de las alteraciones distróficas y un menor número de infiltrados inflamatorios. Además, se pudo demostrar que la disferlina detectada era plenamente funcional y participaba en la reparación de la membrana de las fibras musculares tras las lesiones inducidas por láser. La inyección sistémica de los AAV a través de la vena de la cola, permitió detectar la presencia de la proteína disferlina en todos los músculos del cuerpo, con una expresión máxima del 4% estudiado mediante WB. Estos cambios en la expresión de la proteína se acompañaron

de una mejoría funcional, como se demostró en las pruebas físicas realizadas en el treadmill.

Las técnicas de salto del exón han sido aplicadas con éxito también en las disferlinopatías. El único estudio publicado hasta el momento por el grupo del Dr. Lévy realizó un salto del exón 32 usando oligonucleótidos antisentido en un modelo celular (137).

### **I. Terapias aplicadas en pacientes afectados de una disferlinopatía.**

Se han realizado algunas terapias experimentales en paciente afectados de una disferlinopatía.

Hattori y colaboradores trataron a dos hermanos afectados de una disferlinopatía con fenotipo Miyoshi con 25 mg diarios de dantrolene (138). Ambos pacientes se quejaban de una fatiga precoz con el ejercicio, sin que existiese una debilidad muscular importante. Se demostró una reducción en las cifras de Ck sanguínea pero sin repercusión funcional alguna.

El grupo del Dr. Torrente trató con rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20, a dos pacientes afectados de una disferlinopatía con fenotipo Miyoshi (139). Se administró la medicación a dosis de 375 mg/m<sup>2</sup> semanales durante cuatro semanas consecutivas por vía endovenosa. La fuerza muscular de los pacientes fue estudiada mediante QMA, que consiste en un sistema de dinamómetros asociados a un ordenador, permitiendo establecer una medida cuantitativa objetiva de la fuerza que realiza el paciente. Se demostró una mejoría clínica en ambos pacientes de un 10% y un 20% respectivamente y que era todavía demostrable en el primer caso a los 338 días, y en el segundo caso a

los 223 días. No se realizó estudio histológico de los pacientes ni técnicas de imagen muscular que demostrasen cambios en los músculos afectados.

## **Bibliografia:**

1. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet*. 2002;359(9307):687-95. Epub 2002/03/07.
2. Guglieri M, Magri F, D'Angelo MG, Prella A, Morandi L, Rodolico C, et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Human mutation*. 2008;29(2):258-66. Epub 2007/11/13.
3. Bushby KM. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain : a journal of neurology*. 1999;122 ( Pt 8):1403-20. Epub 1999/08/04.
4. Cossu G, Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(12):520-6. Epub 2007/11/07.
5. Bushby K, Norwood F, Straub V. The limb-girdle muscular dystrophies--diagnostic strategies. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1772(2):238-42. Epub 2006/11/25.
6. Guglieri M, Straub V, Bushby K, Lochmuller H. Limb-girdle muscular dystrophies. *Current opinion in neurology*. 2008;21(5):576-84. Epub 2008/09/05.
7. Laing NG. Genetics of neuromuscular disorders. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2012;49(2):33-48. Epub 2012/04/04.
8. Guglieri M, Bushby K. How to go about diagnosing and managing the limb-girdle muscular dystrophies. *Neurology India*. 2008;56(3):271-80. Epub 2008/11/01.
9. Nguyen K, Bassez G, Krahn M, Bernard R, Laforet P, Labelle V, et al. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Archives of neurology*. 2007;64(8):1176-82. Epub 2007/08/19.
10. Paradas C, Gonzalez-Quereda L, De Luna N, Gallardo E, Garcia-Consuegra I, Gomez H, et al. A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2009;19(1):21-5. Epub 2008/12/17.
11. Klinge L, Aboumoussa A, Eagle M, Hudson J, Sarkozy A, Vita G, et al. New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2010;81(9):946-53. Epub 2009/06/17.
12. Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, Kusaka K, Nishino H. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain : a journal of neurology*. 1986;109 ( Pt 1):31-54. Epub 1986/02/01.
13. Paradas C, Llauger J, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, De Luna N, Iturriaga C, et al. Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology*. 2010;75(4):316-23. Epub 2010/06/25.
14. Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Annals of neurology*. 2001;49(1):130-4. Epub 2001/02/24.
15. Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Tanaka H, Vereshchagin NV, Markova ED, Poleshchuk VV, et al. Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain : a journal of neurology*. 1996;119 ( Pt 6):1895-909. Epub 1996/12/01.
16. Seror P, Krahn M, Laforet P, Leturcq F, Maissonobe T. Complete fatty degeneration of lumbar erector spinae muscles caused by a primary dysferlinopathy. *Muscle & nerve*. 2008;37(3):410-4. Epub 2007/10/13.

17. Nagashima T, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Hayashi YK, Minami N, et al. Dysferlinopathy associated with rigid spine syndrome. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2004;24(4):341-6. Epub 2005/01/12.
18. Illa I, De Luna N, Dominguez-Perles R, Rojas-Garcia R, Paradas C, Palmer J, et al. Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases. *Neurology*. 2007;68(16):1284-9. Epub 2007/02/09.
19. Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylen E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV, et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology*. 2000;55(12):1931-3. Epub 2001/01/03.
20. Amato A, Brown Jr RH. Dysferlinopathies. *Handbook of clinical neurology*. 2011;101:111-8.
21. De Visser M. Computed tomographic findings of the skeletal musculature in sporadic distal myopathy with early adult onset. *Journal of Neurological Sciences*. 1983;59(3):331-9.
22. Linssen WH, Notermans NC, Van der Graaf Y, Wokke JH, Van Doorn PA, Howeler CJ, et al. Miyoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 Dutch patients. *Brain : a journal of neurology*. 1997;120 ( Pt 11):1989-96. Epub 1997/12/16.
23. Brummer D, Walter MC, Palmbach M, Knirsch U, Karitzky J, Tomczak R, et al. Long-term MRI and clinical follow-up of symptomatic and presymptomatic carriers of dysferlin gene mutations. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases*. 2005;24(1):6-16. Epub 2005/11/30.
24. Kesper K, Kornblum C, Reimann J, Lutterbey G, Schroder R, Wattjes MP. Pattern of skeletal muscle involvement in primary dysferlinopathies: a whole-body 3.0-T magnetic resonance imaging study. *Acta neurologica Scandinavica*. 2009;120(2):111-8. Epub 2009/01/22.
25. Gallardo E, Rojas-Garcia R, de Luna N, Pou A, Brown RH, Jr., Illa I. Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology*. 2001;57(11):2136-8. Epub 2001/12/12.
26. De Luna N, Gallardo E, Illa I. In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2004;63(10):1104-13. Epub 2004/11/13.
27. Saito A, Higuchi I, Nakagawa M, Saito M, Hirata K, Suehara M, et al. Miyoshi myopathy patients with novel 5' splicing donor site mutations showed different dysferlin immunostaining at the sarcolemma. *Acta neuropathologica*. 2002;104(6):615-20. Epub 2002/11/01.
28. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, et al. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Human molecular genetics*. 2001;10(17):1761-6. Epub 2001/09/05.
29. Chrobakova T, Hermanova M, Kroupova I, Vondracek P, Marikova T, Mazanec R, et al. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2004;14(10):659-65. Epub 2004/09/08.
30. Selcen D, Stilling G, Engel AG. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology*. 2001;56(11):1472-81. Epub 2001/06/13.
31. Cenacchi G, Fanin M, De Giorgi LB, Angelini C. Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. *Journal of clinical pathology*. 2005;58(2):190-5. Epub 2005/01/29.



32. Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, Brown Jr RH. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Annals of neurology*. 2002;51(1):129-33. Epub 2002/01/10.
33. De Luna N, Freixas A, Gallano P, Caselles L, Rojas-Garcia R, Paradas C, et al. Dysferlin expression in monocytes: a source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2007;17(1):69-76. Epub 2006/10/31.
34. Blandin G, Beroud C, Labelle V, Nguyen K, Wein N, Hamroun D, et al. UMD-DYSF, a novel locus specific database for the compilation and interactive analysis of mutations in the dysferlin gene. *Human mutation*. 2012;33(3):E2317-31. Epub 2012/01/04.
35. Argov Z, Sadeh M, Mazor K, Soffer D, Kahana E, Eisenberg I, et al. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. Clinical and genetic features. *Brain : a journal of neurology*. 2000;123 ( Pt 6):1229-37. Epub 2000/05/29.
36. Cagliani R, Fortunato F, Giorda R, Rodolico C, Bonaglia MC, Sironi M, et al. Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel DYSF mutations and possible founder effect in the Italian population. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2003;13(10):788-95. Epub 2003/12/18.
37. Santos R, Oliveira J, Vieira E, Coelho T, Carneiro AL, Evangelista T, et al. Private dysferlin exon skipping mutation (c.5492G>A) with a founder effect reveals further alternative splicing involving exons 49-51. *Journal of human genetics*. 2010;55(8):546-9. Epub 2010/06/11.
38. Vernengo L, Oliveira J, Krahn M, Vieira E, Santos R, Carrasco L, et al. Novel ancestral Dysferlin splicing mutation which migrated from the Iberian peninsula to South America. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2011;21(5):328-37. Epub 2011/03/12.
39. Vilchez JJ, Gallano P, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Freixas A, et al. Identification of a novel founder mutation in the DYSF gene causing clinical variability in the Spanish population. *Archives of neurology*. 2005;62(8):1256-9. Epub 2005/08/10.
40. Leshinsky-Silver E, Argov Z, Rozenboim L, Cohen S, Tzofi Z, Cohen Y, et al. Dysferlinopathy in the Jews of the Caucasus: a frequent mutation in the dysferlin gene. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2007;17(11-12):950-4. Epub 2007/09/11.
41. Weiler T, Bashir R, Anderson LV, Davison K, Moss JA, Britton S, et al. Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Human molecular genetics*. 1999;8(5):871-7. Epub 1999/04/10.
42. Krahn M, Illa I, Levy N, Bushby K. 172nd ENMC International Workshop: dysferlinopathies 29-31 January 2010, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2011;21(7):503-12. Epub 2011/05/24.
43. Han R, Campbell KP. Dysferlin and muscle membrane repair. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(4):409-16. Epub 2007/07/31.
44. Posey AD, Jr., Demonbreun A, McNally EM. Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth. *Current topics in developmental biology*. 2011;96:203-30. Epub 2011/05/31.
45. Anderson LV, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human molecular genetics*. 1999;8(5):855-61. Epub 1999/04/10.
46. Klinge L, Laval S, Keers S, Haldane F, Straub V, Barresi R, et al. From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(8):1768-76. Epub 2007/03/17.

47. Azakir BA, Di Fulvio S, Therrien C, Sinnreich M. Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. *PloS one*. 2010;5(4):e10122. Epub 2010/04/21.
48. Klinge L, Harris J, Sewry C, Charlton R, Anderson L, Laval S, et al. Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle. *Muscle & nerve*. 2010;41(2):166-73. Epub 2010/01/19.
49. Chiu YH, Hornsey MA, Klinge L, Jorgensen LH, Laval SH, Charlton R, et al. Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Human molecular genetics*. 2009;18(11):1976-89. Epub 2009/03/17.
50. Therrien C, Di Fulvio S, Pickles S, Sinnreich M. Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. *Biochemistry*. 2009;48(11):2377-84. Epub 2009/03/04.
51. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*. 2003;423(6936):168-72. Epub 2003/05/09.
52. Roche JA, Lovering RM, Bloch RJ. Impaired recovery of dysferlin-null skeletal muscle after contraction-induced injury in vivo. *Neuroreport*. 2008;19(16):1579-84. Epub 2008/09/26.
53. Benaud C, Gentil BJ, Assard N, Court M, Garin J, Delphin C, et al. AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *The Journal of cell biology*. 2004;164(1):133-44. Epub 2003/12/31.
54. Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH, Jr. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(50):50466-73. Epub 2003/09/25.
55. Cai C, Weisleder N, Ko JK, Komazaki S, Sunada Y, Nishi M, et al. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(23):15894-902. Epub 2009/04/22.
56. Huang Y, Laval SH, van Remoortere A, Baudier J, Benaud C, Anderson LV, et al. AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(3):732-42. Epub 2006/12/23.
57. De Backer F, Vandebrouck C, Gailly P, Gillis JM. Long-term study of Ca(2+) homeostasis and of survival in collagenase-isolated muscle fibres from normal and mdx mice. *The Journal of physiology*. 2002;542(Pt 3):855-65. Epub 2002/08/03.
58. Robert V, Massimino ML, Tosello V, Marsault R, Cantini M, Sorrentino V, et al. Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(7):4647-51. Epub 2000/10/13.
59. Turner PR, Fong PY, Denetclaw WF, Steinhardt RA. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *The Journal of cell biology*. 1991;115(6):1701-12. Epub 1991/12/01.
60. Bodensteiner JB, Engel AG. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology*. 1978;28(5):439-46. Epub 1978/05/01.
61. Franco A, Jr., Lansman JB. Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature*. 1990;344(6267):670-3. Epub 1990/04/22.
62. Alderton JM, Steinhardt RA. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends in cardiovascular medicine*. 2000;10(6):268-72. Epub 2001/04/03.

63. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiological reviews*. 2003;83(3):731-801. Epub 2003/07/05.
64. Vandebrouck A, Ducret T, Basset O, Sebille S, Raymond G, Ruegg U, et al. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(1):136-8. Epub 2005/10/29.
65. Roche JA, Lovering RM, Roche R, Ru LW, Reed PW, Bloch RJ. Extensive mononuclear infiltration and myogenesis characterize recovery of dysferlin-null skeletal muscle from contraction-induced injuries. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;298(2):C298-312. Epub 2009/11/20.
66. Jethwaney D, Islam MR, Leidal KG, de Bernabe DB, Campbell KP, Nauseef WM, et al. Proteomic analysis of plasma membrane and secretory vesicles from human neutrophils. *Proteome science*. 2007;5:12. Epub 2007/08/19.
67. Nagaraju K, Rawat R, Veszelszky E, Thapliyal R, Kesari A, Sparks S, et al. Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *The American journal of pathology*. 2008;172(3):774-85. Epub 2008/02/16.
68. Rawat R, Cohen TV, Ampong B, Francia D, Henriques-Pons A, Hoffman EP, et al. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. *The American journal of pathology*. 2010;176(6):2891-900. Epub 2010/04/24.
69. Han R, Frett EM, Levy JR, Rader EP, Lueck JD, Bansal D, et al. Genetic ablation of complement C3 attenuates muscle pathology in dysferlin-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(12):4366-74. Epub 2010/11/10.
70. De Luna N, Gallardo E, Sonnet C, Chazaud B, Dominguez-Perles R, Suarez-Calvet X, et al. Role of thrombospondin 1 in macrophage inflammation in dysferlin myopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2010;69(6):643-53. Epub 2010/05/15.
71. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1961;9:493-5. Epub 1961/02/01.
72. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(1):11-9. Epub 2010/01/07.
73. Sampaoli M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*. 2006;444(7119):574-9. Epub 2006/11/17.
74. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7. Epub 1997/02/14.
75. Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, Serruys PW. Adipose-derived cells. *Cell transplantation*. 2007;16(9):963-70. Epub 2008/02/26.
76. Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE. Are human and mouse satellite cells really the same? *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2010;58(11):941-55. Epub 2010/07/21.
77. Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS, Sesodia S. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Developmental biology*. 1990;141(1):24-40. Epub 1990/09/01.
78. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, et al. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *The Journal of cell biology*. 2000;151(6):1221-34. Epub 2000/12/21.

79. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 9):1824-32. Epub 2006/04/13.
80. Kuang S, Charge SB, Seale P, Huh M, Rudnicki MA. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *The Journal of cell biology*. 2006;172(1):103-13. Epub 2006/01/05.
81. Tajbakhsh S, Bober E, Babinet C, Pournin S, Arnold H, Buckingham M. Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1996;206(3):291-300. Epub 1996/07/01.
82. Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC. Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells. *Annals of neurology*. 1992;31(1):46-52. Epub 1992/01/01.
83. Price FD, Kuroda K, Rudnicki MA. Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1772(2):272-83. Epub 2006/10/13.
84. Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends in cell biology*. 2005;15(12):666-73. Epub 2005/10/26.
85. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Developmental biology*. 1998;194(1):114-28. Epub 1998/03/14.
86. Floss T, Arnold HH, Braun T. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes & development*. 1997;11(16):2040-51. Epub 1997/08/15.
87. Musaro A. Growth factor enhancement of muscle regeneration: a central role of IGF-1. *Archives italiennes de biologie*. 2005;143(3-4):243-8. Epub 2005/08/16.
88. Wozniak AC, Anderson JE. Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2007;236(1):240-50. Epub 2006/11/23.
89. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *The Journal of cell biology*. 2004;166(3):347-57. Epub 2004/07/28.
90. Conboy IM, Rando TA. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Developmental cell*. 2002;3(3):397-409. Epub 2002/10/04.
91. Tidball JG, Berchenko E, Frenette J. Macrophage invasion does not contribute to muscle membrane injury during inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 1999;65(4):492-8. Epub 1999/04/16.
92. Nguyen HX, Tidball JG. Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use in mice. *The Journal of physiology*. 2003;550(Pt 2):347-56. Epub 2003/05/27.
93. Summan M, Warren GL, Mercer RR, Chapman R, Hulderman T, Van Rooijen N, et al. Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2006;290(6):R1488-95. Epub 2006/01/21.
94. Teixeira CF, Zamuner SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, et al. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key

role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle & nerve*. 2003;28(4):449-59. Epub 2003/09/25.

95. Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exercise and sport sciences reviews*. 2009;37(1):18-22. Epub 2008/12/23.

96. St Pierre BA, Tidball JG. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol*. 1994;77(1):290-7. Epub 1994/07/01.

97. Paylor B, Natarajan A, Zhang RH, Rossi F. Nonmyogenic cells in skeletal muscle regeneration. *Current topics in developmental biology*. 2011;96:139-65. Epub 2011/05/31.

98. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(1):23-35. Epub 2003/01/04.

99. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(5):1057-69. Epub 2007/05/09.

100. Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Human molecular genetics*. 2009;18(3):482-96. Epub 2008/11/11.

101. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279(5356):1528-30. Epub 1998/03/21.

102. Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR, Meyerrose T, Nolte JA, Gilgoff I, et al. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(6):807-14. Epub 2002/09/18.

103. Ferrari G, Stornaiuolo A, Mavilio F. Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature*. 2001;411(6841):1014-5. Epub 2001/06/29.

104. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(4):1797-806. Epub 1996/04/01.

105. Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nature medicine*. 2003;9(12):1520-7. Epub 2003/11/20.

106. Montanaro F, Liadaki K, Volinski J, Flint A, Kunkel LM. Skeletal muscle engraftment potential of adult mouse skin side population cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(16):9336-41. Epub 2003/07/30.

107. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *The Journal of cell biology*. 2002;159(1):123-34. Epub 2002/10/16.

108. Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G, et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(2):182-95. Epub 2004/07/16.

109. Benchaouir R, Meregalli M, Farini A, D'Antona G, Belicchi M, Goyenvallé A, et al. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-

- engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell stem cell*. 2007;1(6):646-57. Epub 2008/03/29.
110. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology*. 1974;2(2):83-92. Epub 1974/01/01.
  111. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. Epub 2006/08/23.
  112. Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, et al. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nature cell biology*. 2003;5(7):640-6. Epub 2003/06/07.
  113. Zheng B, Cao B, Crisan M, Sun B, Li G, Logar A, et al. Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nature biotechnology*. 2007;25(9):1025-34. Epub 2007/09/04.
  114. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*. 2008;3(3):301-13. Epub 2008/09/13.
  115. Crisan M, Chen CW, Corselli M, Andriolo G, Lazzari L, Peault B. Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1176:118-23. Epub 2009/10/03.
  116. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28. Epub 2001/04/17.
  117. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(9):1397-405. Epub 2005/05/04.
  118. Vieira NM, Bueno CR, Jr., Brandalise V, Moraes LV, Zucconi E, Secco M, et al. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells*. 2008;26(9):2391-8. Epub 2008/06/28.
  119. Mounier R, Chretien F, Chazaud B. Blood vessels and the satellite cell niche. *Current topics in developmental biology*. 2011;96:121-38. Epub 2011/05/31.
  120. Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier FJ, et al. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(4):1397-409. Epub 2007/02/09.
  121. Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature cell biology*. 2010;12(2):153-63. Epub 2010/01/19.
  122. Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, et al. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*. 2002;129(11):2773-83. Epub 2002/05/17.
  123. Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA, et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 2003;301(5632):487-92. Epub 2003/07/12.
  124. Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces

- mesoangioblast migration and proliferation. *The Journal of cell biology*. 2004;164(3):441-9. Epub 2004/01/28.
125. Galvez BG, Sampaolesi M, Brunelli S, Covarello D, Gavina M, Rossi B, et al. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *The Journal of cell biology*. 2006;174(2):231-43. Epub 2006/07/13.
  126. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nature cell biology*. 2007;9(3):255-67. Epub 2007/02/13.
  127. Dellavalle A, Maroli G, Covarello D, Azzoni E, Innocenzi A, Perani L, et al. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nature communications*. 2011;2:499. Epub 2011/10/13.
  128. Cossu G, Sampaolesi M. Novel treatments under development for muscular dystrophy. *Discovery medicine*. 2004;4(24):390-5. Epub 2004/12/01.
  129. Torrente Y, Belicchi M, Marchesi C, Dantona G, Cogiamanian F, Pisati F, et al. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell transplantation*. 2007;16(6):563-77. Epub 2007/10/05.
  130. Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E, Bashir R, Vafiadaki E, Ivanova S, et al. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nature genetics*. 1999;23(2):141-2. Epub 1999/10/03.
  131. Ho M, Post CM, Donahue LR, Lidov HG, Bronson RT, Goolsby H, et al. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Human molecular genetics*. 2004;13(18):1999-2010. Epub 2004/07/16.
  132. Kobayashi K, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. The distribution and characterization of skeletal muscle lesions in dysferlin-deficient SJL and A/J mice. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2010;62(5):509-17. Epub 2009/07/21.
  133. Lostal W, Bartoli M, Bourg N, Roudaut C, Bentaib A, Miyake K, et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Human molecular genetics*. 2010;19(10):1897-907. Epub 2010/02/16.
  134. Leriche-Guerin K, Anderson LV, Wrogemann K, Roy B, Goulet M, Tremblay JP. Dysferlin expression after normal myoblast transplantation in SCID and in SJL mice. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2002;12(2):167-73. Epub 2001/12/12.
  135. Kong KY, Ren J, Kraus M, Finklestein SP, Brown RH, Jr. Human umbilical cord blood cells differentiate into muscle in sjl muscular dystrophy mice. *Stem Cells*. 2004;22(6):981-93. Epub 2004/11/13.
  136. Krahn M, Wein N, Bartoli M, Lostal W, Courrier S, Bourg-Alibert N, et al. A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Science translational medicine*. 2010;2(50):50ra69. Epub 2010/09/24.
  137. Wein N, Avril A, Bartoli M, Beley C, Chaouch S, Laforet P, et al. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Human mutation*. 2010;31(2):136-42. Epub 2009/12/03.
  138. Hattori H, Nagata E, Oya Y, Takahashi T, Aoki M, Ito D, et al. A novel compound heterozygous dysferlin mutation in Miyoshi myopathy siblings responding to dantrolene. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2007;14(11):1288-91. Epub 2007/09/18.
  139. Lerario A, Cogiamanian F, Marchesi C, Belicchi M, Bresolin N, Porretti L, et al. Effects of rituximab in two patients with dysferlin-deficient muscular dystrophy. *BMC musculoskeletal disorders*. 2010;11:157. Epub 2010/07/14.





## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL**



## HIPÓTESIS:

### DIAGNÓSTICA.

1.- La expresión de disferlina en monocitos de sangre periférica corre paralela a la muscular y permite diferenciar entre pacientes afectados de una disferlinopatía y pacientes con otras distrofias neuromusculares, sin necesidad de efectuar una biopsia muscular.

### TERAPÉUTICA

2.- El tratamiento con vitamina D3 es capaz de incrementar la expresión de disferlina en cultivos celulares *in vitro* y en humanos portadores de una mutación en el gen DYSF.

3.-El trasplante de mesoangioblastos murinos obtenidos de biopsias musculares de ratones adultos es efectivo como terapia en un modelo animal de distrofia muscular por déficit de disferlina.

### REGENERACIÓN MUSCULAR

4.- Los pericitos participan de forma activa en la regeneración muscular en las distrofias musculares en humanos.



## **OBJETIVO GENERAL:**

Profundizar en las estrategias diagnósticas y terapéuticas de la distrofia muscular por déficit de disferlina y determinar el papel de los pericitos en la regeneración muscular.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

### **DIAGNÓSTICO**

1. Estudiar si existe una correlación directa entre los niveles de disferlina en músculo y en monocitos de sangre periférica de pacientes afectos de una distrofia por déficit de disferlina y controles.
2. Estudiar los diferentes patrones de expresión de disferlina en las biopsias musculares de pacientes afectos de una distrofia muscular por déficit de disferlina y compararlos con los patrones en otras distrofias musculares.
3. Determinar si la cuantificación de disferlina en monocitos es una herramienta útil en la distinción entre pacientes, portadores y sujetos sanos.

### **TRATAMIENTO**

#### **VITAMINA D3**

4. Evidenciar si las células HL60 tratadas con vitamina D3 diferencian de forma efectiva a monocito expresando niveles de disferlina similares a los monocitos de controles sanos.

5. Estudiar si el tratamiento con vitamina D3 es capaz de incrementar la expresión de disferlina en cultivos celulares *in vitro* y en humanos portadores de una mutación en el gen de la disferlina.

### **MESANGIOBLASTOS**

6. Aislar mesoangioblastos procedentes de músculo esquelético de ratones adultos y caracterizarlos, estudiando su capacidad proliferativa, de diferenciación a diversos tejidos mesodérmicos y el patrón de expresión de proteínas de superficie.
7. Estudiar si el transplante de MABs murinos obtenidos de biopsias musculares de ratones adultos es efectivo como terapia en un modelo murino de distrofia muscular por déficit de disferlina.

### **REGENERACIÓN MUSCULAR**

8. Confirmar que los mesoangioblastos humanos, células madres mesenquimales obtenidas desde biopsias musculares, son en realidad pericitos.
9. Estudiar si los pericitos participan de forma activa en el proceso de regeneración muscular *in vivo* en pacientes con distrofia muscular.

## **RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





**ARTÍCULO I: Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy.**

**Gallardo E, de Luna N, Díaz-Manera J, Rojas-García R, Gonzalez-Quereda L, Flix B, de Morrée A, van der Maarel S, Illa I.**

**PLoS One. 2011;6(12):e29061.**



## **Artículo I: Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy.**

### **Hipótesis:**

El estudio de la expresión de disferlina en monocitos obtenidos desde sangre periférica permite diferenciar entre pacientes afectados de una disferlinopatía y pacientes con otras enfermedades neuromusculares.

### **Resultados:**

#### ***Doble banda en WB monocitos***

En ensayos previos habíamos observado, al realizar un WB de extractos de monocitos, que los anticuerpos anti-disferlina reconocían una doble banda, alrededor de los 230 KDa, hecho que no ocurre al realizar WB de extracto de músculo. Para demostrar que ambas bandas correspondían a la proteína, transfectamos monocitos con un RNA de silenciamiento (siRNA) dirigido contra la disferlina y pudimos observar como la intensidad de ambas bandas decrecía de forma significativa. Posteriormente realizamos estudios de inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos dirigidos contra diferentes partes de la proteína disferlina, evidenciando una desaparición del doblete. Estos resultados indicaron que el doblete correspondía a la disferlina. Por lo tanto, la cuantificación de la expresión de disferlina usando las dos bandas es correcta para diferenciar pacientes de portadores o controles sanos (ver figura 1 del artículo).

#### ***Correlación músculo-monocitos***

Para determinar si existía una correlación entre la expresión de disferlina en músculo y en monocitos estudiamos muestras de 17 pacientes con disferlinopatía confirmada

genéticamente y de 21 pacientes afectados de enfermedades musculares diferentes a la disferlinopatía. Demostramos niveles similares de disferlina en monocitos y en músculo en todos los casos. Las muestras de los 17 pacientes con disferlinopatía mostraron una expresión de alrededor del 1% tanto en monocitos como en músculos. Las 21 muestras de otras distrofias incluían pacientes con enfermedades musculares en las que se ha descrito una expresión anómala de disferlina, cuando se estudia mediante técnicas de microscopía óptica, como la distrofia por déficit de calpaína o con mutaciones en ANO5. El WB de músculo y de monocitos fue nuevamente concordante y la expresión se valoró en el 100% en todos los casos. Finalmente, el estudio de dos portadores sintomáticos de una única mutación en el gen de la disferlina mostró igualmente una gran correlación, ya que se obtuvo una cuantificación de la expresión cercana al 30% tanto en WB de monocitos como en el de músculo esquelético (ver figuras 2-3 y tablas 1-2 del artículo).

#### ***Patrón inmunohistoquímico de disferlina en músculo***

Analizamos el patrón de expresión de disferlina en músculo esquelético de los 17 pacientes afectados de disferlinopatía. En 11 de los casos observamos una ausencia de expresión de disferlina. En los restantes 6 casos se observó una expresión parcial en músculo identificándose dos patrones claramente diferenciados: a) un patrón granular en el sarcoplasma de algunas fibras (3/6 casos) y b) una tinción parcheada en la membrana de fibras aisladas (3/6 casos). El análisis mediante WB de la expresión de disferlina en estos seis casos mostró valores cercanos al 0,1%. No encontramos una correlación entre el tipo de mutación padecida y el tipo de expresión residual en músculo de disferlina estudiada mediante IHQ.

El análisis del patrón de expresión de los 21 músculos procedentes de pacientes con miopatías diferentes a la disferlinopatía permitió definir cuatro patrones de expresión diferenciados: a) expresión normal en la membrana de las fibras musculares, b) expresión reducida pero homogénea (no parcheada) en la membrana de las fibras musculares, c) expresión reducida en la membrana pero aumentada en el sarcoplasma de todas las fibras musculares y d) expresión reducida en la membrana pero aumentada en el sarcoplasma de algunas fibras musculares (ver figura 4 del artículo).

### **Discusión:**

Este trabajo demuestra que existe una correlación positiva en el estudio de la expresión de disferlina mediante WB en músculo y en monocitos de sangre periférica. En efecto, el análisis de 17 pacientes con disferlinopatía mostró una ausencia de disferlina en ambas muestras, mientras que el análisis de 21 pacientes con otras enfermedades neuromusculares demostró una expresión normal de disferlina.

En cambio, los resultados obtenidos de la inmunohistoquímica no fueron concluyentes, ya que se detectaron déficits de disferlina tanto en muestras de pacientes con disferlinopatía como en aquellos con otras miopatías. Estos resultados demuestran como técnica ideal de estudio de expresión de disferlina en músculo esquelético el WB, y que la IH puede llevar a equívocos. Además, el análisis de disferlina por WB de monocitos de sangre periférica, es una forma fácil, asequible y segura de identificar pacientes. De hecho en aquellos casos donde la biopsia muscular sea pequeña, esté en mal estado o no tenga ya apenas fibras musculares por el estado avanzado de la enfermedad, el estudio de expresión de disferlina en monocitos debería substituir al WB de músculo.

Diversos autores han estudiado los patrones inmunohistoquímicos de expresión de disferlina en músculo de pacientes con una disferlinopatía demostrando divergencias

entre los resultados de la inmunohistoquímica y el WB, pero en ninguno de los casos se había comparado esta expresión con el estudio en monocitos. Tagawa y colaboradores demostraron una expresión alterada de disferlina en un 19% de los pacientes con distrofias musculares diferentes a la disferlinopatía y en hasta un 50% de los pacientes con otras enfermedades neuromusculares. Tagawa describió cuatro patrones diferentes en la inmunohistoquímica: normal, ausente, acúmulo citoplasmático anormal y una tinción débil. El grupo de Lo y colaboradores publicó que en 25 de 76 casos de distrofia muscular de cinturas diferente a la LGMD2B se hallaban alteraciones en la tinción de disferlina. Este mismo autor diferenció entre cuatro patrones diversos: déficit, tinción reducida de la membrana, tinción reducida en la membrana con un aumento patológico de la tinción sarcoplásmica y tinción reducida en la membrana pero con acúmulo variable en el sarcoplasma de algunas fibras.

Esta disparidad entre los resultados de la biopsia y del WB de músculo puede deberse a que la disferlina interacciona con un gran número de proteínas como anexina-1 y 2, calpaína-3, caveolina-3, AHNAK, afixina, MG53 y tubulina. Se cree que una alteración de las proteínas que interaccionan con la disferlina pueden producir una distribución anómala de disferlina en las fibras musculares descrita previamente. Es por este motivo que el estudio de disferlina mediante WB debe ser complementario al de la IH.

Como conclusión de estos estudios, cuando la sospecha clínica de disferlinopatía es alta, se puede realizar en primer lugar un WB de monocitos. Si este resultado es anormal, se puede realizar la secuenciación del gen DYSF de forma directa. En cambio si el resultado es normal, se descartar que el paciente sufra una disferlinopatía.

**ARTÍCULO II:  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D3 increases dysferlin expression *in vitro*  
and in a human clinical trial**

**Díaz-Manera J, De Luna N, Paradas C, Iturriaga C, Rojas-García R, Araque J,  
Genebriera M, Gich I, Illa I, Gallardo E.**

**Molecular therapy 2012 Oct;20(10):1988-97**





## **ARTÍCULO II: $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D3 increases dysferlin expression *in vitro* and in a human clinical trial**

### **Hipótesis:**

La vitamina D induce la diferenciación de las células HL60 a monocito a través de la activación de la expresión de disferlina. Si esta hipótesis es correcta, la vitamina D incrementará la expresión de disferlina en músculo tanto *in vivo* como *in vitro*.

### **Resultados:**

#### ***Vitamina D3 y disferlina in vitro***

En primer lugar estudiamos los efectos que la vitamina D3 tenía sobre las células HL60. Usando diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 100 nM) evidenciamos una correlación positiva entre la concentración de vitamina D y el incremento en la expresión de disferlina, obteniendo la máxima expresión con dosis de 100 nM a los cinco días del tratamiento. Estas dosis de vitamina inhibió la proliferación de las células e indujo su diferenciación a monocitos CD14 positivos. Con la intención de elucidar si el incremento en la expresión de disferlina era una mera consecuencia de la diferenciación celular o tenía alguna relación directa con el tratamiento con vitamina D3, usamos diferentes inhibidores de la cascada molecular activada por la vitamina D3. El compuesto UO126 (4-diamino-2, 3 diciano-1, 4 bis (2-aminofenilthio) butadieno) es un inhibidor selectivo de las MAP quinasas. Su adición al medio de cultivo enriquecido en vitamina D3 no inducía cambio alguno en la capacidad de diferenciación de las células HL60 a monocitos. Sin embargo la expresión de disferlina a las 72 horas del tratamiento caía de forma estadísticamente significativa, aunque no desaparecía de forma completa

sugiriendo que otras vías de señalización podían mediar en la activación de la expresión de disferlina por la vitamina D3. Por este motivo, estudiamos si existía una vía de activación directa de la disferlina por el receptor de la vitamina D3. Evidenciamos una secuencia específica para dicho receptor en el promotor de la disferlina. Transfectamos células H·K-293 con un plásmido que contenía la secuencia consenso que habíamos detectado en el promotor de la disferlina asociado a la luciferasa. El tratamiento de dichas células con vitamina D3 incrementaba de forma significativa la actividad de la luciferasa, demostrando la existencia de una vía directa de activación genómica por parte del receptor de la vitamina D3 ( ver figuras 1 y 2 del artículo)

Estudiamos los efectos que el tratamiento con vitamina D3 podría tener sobre la expresión de disferlina por otros tipos celulares, en especial sobre monocitos y mioblastos/miotubos. Es conocido que la expresión de disferlina está reducida, pero no ausente, en células procedentes de portadores de una sola mutación en el gen *DYSF*. El tratamiento de los monocitos y de miotubos maduros, obtenidos de pacientes portadores, con vitamina D3 a dosis de 100 nM aumentaba de forma significativa la expresión de disferlina comparada con los controles no tratados (ver figura 3 del artículo).

### ***Variabilidad temporal de la expresión de disferlina en monocitos humanos***

En primer lugar quisimos asegurarnos de que la expresión de disferlina por los monocitos fuese constante a lo largo del tiempo. Para ello, estudiamos monocitos de controles sanos obtenidos de forma consecutiva a las 0, 2 y 4 semanas. No evidenciamos variaciones significativas en la expresión de disferlina.

Se estudió la expresión de disferlina en monocitos de sangre periférica en un grupo de controles sanos (n:80), portadores de una sola mutación (n:53) o enfermos con dos

mutaciones en el gen de la disferlina (n:20). Como habíamos publicado previamente todos los controles mostraron niveles normales de expresión, mientras que los pacientes tuvieron niveles indetectables o muy reducidos (rango de 0 a 11%). Todos los portadores tenían niveles intermedios de expresión de disferlina.

El análisis de los resultados nos permitió establecer puntos de corte en la expresión de disferlina: valores por debajo del 23% de expresión predecían la condición de enfermo con una sensibilidad del 96% y una especificidad del 92%, mientras que valores entre el 23 y el 75% predecían la condición de portador con una sensibilidad y especificidad del 97%. Valores superiores al 75% se consideraron dentro de la normalidad (ver figura 5 del artículo).

### ***Vitamina D3 y disferlina in vivo.***

Con la intención de evaluar si el tratamiento con vitamina D3 tenía un efecto sobre la expresión de disferlina *in vivo*, diseñamos un ensayo randomizado abierto de tratamiento con calcitriol durante un año en portadores de una única mutación en el gen de la disferlina (Eudra-CT: 2007-005808-41). Incluimos en el estudio a 23 voluntarios, que fueron randomizados en una proporción 3:1 a vitamina D (una ampolla de hidroferol semanal, lo que representa unas 16.000 UI de vitamina D) o no tratamiento. De los 17 voluntarios tratados, dos abandonaron el tratamiento antes de su finalización, motivo por el que sus resultados fueron descartados. Todos los voluntarios no tratados (n:6) cumplieron con el seguimiento. Evidenciamos un incremento medio en la expresión de disferlina en monocitos en el grupo que recibió vitamina D del 43,1%, lo que comparada con el incremento observado en los portadores no tratados (9,8%), mostró diferencias estadísticamente significativas (Greenhouse-Geisser test, p: 0,037). (ver figura 6 del artículo). Este aumento en los niveles de la disferlina no se

correlacionaba ni con el sexo, ni con la edad ni con el tipo de mutación de los portadores analizados. El tratamiento fue tolerado de forma correcta y no hubo efectos secundarios destacables. De forma complementaria, durante el estudio realizamos una RM muscular pre y postratamiento sin que se observase patología en ninguno de los casos excepto en una paciente portadora sintomática de la enfermedad incluída en el estudio. En este caso en concreto, a pesar de que los niveles de disferlina se normalizaron, pasando del 39,9 al 114%, no hubo modificación ni en la clínica, ni en las analíticas (niveles de Cks elevados de forma mantenida) ni en la resonancia magnética (atrofia parcial del adductor mayor y gemelo medial).

### **Discusión:**

En este trabajo hemos demostrado como el tratamiento con vitamina D aumenta la expresión de disferlina tanto *in vitro*, en diferentes modelos celulares, como *in vivo*, en un ensayo clínico. El estudio realizado *in vitro* con miotubos de un paciente portador de una única mutación en el gen DYSF mostró que los niveles de disferlina aumentaban de forma paralela a como lo hacía la concentración de vitamina D3. Los mismos resultados se obtuvieron con monocitos de sangre periférica. Dichos resultados fueron confirmados *in vivo* gracias a la realización de un ensayo clínico.

El efecto que la vitamina D3 tiene sobre la expresión de la disferlina está mediado por dos vías diferentes. Por un lado, una vía relacionada con la cascada MAPK y, por otro, una vía génica directa activada por el receptor de vitamina D. Nuestros experimentos con UO126, un inhibidor de la vía MAPK, han mostrado una reducción pero no inhibición completa de la expresión de disferlina tras el tratamiento de las células HL60 con vitamina D3. Hemos demostrado además la existencia de una secuencia consenso en el promotor del gen DYSF para el receptor de membrana de la vitamina D. Ambos

resultados confirman la existencia de dos vías posibles de activación de la expresión de disferlina mediada por vitamina D3, una directa a través del receptor y otra indirecta a través de la cascada MAPK.

La vitamina D3 tiene además un posible papel en la homeostasis de las células miogénicas. Por un lado hemos comprobado que la vitamina D3 promueve la proliferación de los mioblastos y su diferenciación a miotubos. Estos resultados están en consonancia con investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio, donde demostramos que la disferlina juega un papel importante en la diferenciación muscular en humanos. De hecho mioblastos procedentes de pacientes con déficit de disferlina diferencian de forma aberrante y presentan niveles reducidos de miogenina. Además, el grupo del Dr. Tremblay, ha demostrado que cultivar mioblastos con medios ricos en vitamina D3 previamente a su inyección intramuscular en animales distróficos mejora su supervivencia y su capacidad de fusión con las fibras musculares distróficas.

Creemos que en vista de nuestros resultados la mejoría en la capacidad de fusión de los mioblastos podría deberse a un incremento en la expresión de disferlina.

Se ha descrito que la cascada MAPK se activa con el incremento de calcio intracelular a través de la proteína quinasa II dependiente de la calmodulina. Hay que recordar que diversos autores han sugerido que también la disferlina se activa en respuesta a un incremento de calcio intracelular. Se puede plantear por tanto un modelo en el que tras una disrupción de la membrana de la fibra muscular, los niveles de calcio intracelular aumentan de forma considerable activando no sólo el mecanismo de reparación de la membrana del que la disferlina forma parte, si no también la síntesis de disferlina por la fibra muscular a través de la cascada MAPK. .

En este trabajo hemos demostrado que las células HL60 tratadas con vitamina D3 diferencian a monocitos expresando disferlina. Por tanto, esta línea celular puede

utilizarse como un modelo de estudio adecuado que nos permita conocer la función de la disferlina en los monocitos. Sabemos que los monocitos deficitarios en disferlina poseen una mayor actividad fagocítica que podría empeorar la patología muscular producida por el déficit de disferlina muscular. De hecho, en la biopsia muscular de los pacientes con disferlinopatía es frecuente encontrar infiltrados inflamatorios constituidos especialmente por macrófagos.

Nuestros resultados *in vivo* han mostrado que el tratamiento con vitamina D3 aumenta la expresión de disferlina en monocitos de forma significativa. Los niveles de disferlina en monocitos de portadores de una única mutación en el gen DYSF pueden mostrar una reducción importante, obteniéndose en algunos casos una expresión no superior al 24%. Tras el tratamiento con vitamina D hemos observado un incremento medio del 42%. Gracias a estos resultados podemos inferir que la vitamina D3 podría ser una posible terapia coadyuvante de tratamientos destinados a reparar mutaciones que afecten a uno de los alelos del gen DYSF. En este sentido, una combinación de terapia farmacológica (PTC124 o exon-skipping) y vitamina D3 pueden llevar a la disferlina hasta niveles cercanos a la normalidad. Nuestro estudio observacional demuestra que el tratamiento con vitamina D3 incrementa la expresión de disferlina en monocitos de sangre periférica. Pero además, como hemos descrito previamente, existe una correlación positiva entre los niveles de disferlina en monocitos y aquellos en músculo esquelético, lo que sugiere que el aumento en la expresión de disferlina en monocitos tras la administración de vitamina D ocurre igualmente en músculo esquelético. Existen evidencias de que la vitamina D3 mejora la función muscular a dosis incluso menores que las usadas en nuestro trabajo. No obstante, a pesar de que en la única paciente portadora sintomática incluida en el estudio demostramos una normalización de la expresión de disferlina tras un año de tratamiento, no se evidenciaron cambios en sus

cifras de Cks y/o en la resonancia magnética muscular. Este resultado sugiere que un año de tratamiento no es suficiente para mejorar la función muscular en estos pacientes. No obstante, el hecho de que la paciente no empeorase clínicamente y que la resonancia no mostrase una progresión de la atrofia muscular, indican que la enfermedad no empeoró significativamente después de un año de tratamiento, siendo esto relevante desde un punto de vista clínico. Nuestro grupo está ahora mismo participando en un estudio internacional de tres años de duración sobre la historia natural de la enfermedad que incluye entre otros estudios repetidos con resonancia muscular, y que nos permitirá determinar cuál es la progresión esperable de la enfermedad.

En relación con la dosis de la medicación, se ha descrito que 20.000 UI de D3 mejoraron las alteraciones de la marcha de un paciente con una miopatía proximal. Se considera una dosis excesiva a partir de 50.000 UI de D3, relacionado normalmente con efectos adversos como por ejemplo hipercalcemia, litiasis renal, dolor muscular, conjuntivitis, pérdida de peso o vómitos.

Cabe destacar que el tratamiento con vitamina D3 aumenta de forma notable la expresión de mRNA en las células de los pacientes. Nuestra experiencia después de años de trabajo con estas células es que la expresión mRNA es normalmente de 0%. Lo mismo ocurre a nivel protéico, donde sea cual sea la mutación que afecta al gen DYSF, los niveles de disferlina son casi indetectables en todos los pacientes. Algunos autores defienden la posibilidad de que el sistema de degradación protéica celular ubiquitina-proteasoma destruya la disferlina no funcionante. En ese caso, la combinación de fármacos que inhiban ese complejo asociado a un tratamiento con vitamina D3 podrían aumentar de forma considerable los niveles de disferlina.

En conclusión, nuestro estudio demuestra que la vitamina D3 promueve un incremento en la expresión de disferlina en el músculo esquelético humano y en monocitos de

sangre periférica tanto en experimento *in vitro* como *in vivo* tras la realización de un ensayo clínico. Estos resultados pueden tener implicaciones importantes en futuras terapias en las que se combine vitamina D3 con diferentes estrategias de terapia molecular.



**ARTÍCULO III: Partial dysferlin reconstitution by adult murine mesoangioblasts is sufficient for full functional recovery in a murine model of dysferlinopathy.**

**Díaz-Manera J, Touvier T, Dellavalle A, Tonlorenzi R, Tedesco FS, Messina G, Meregalli M, Navarro C, Perani L, Bonfanti C, Illa I, Torrente Y, Cossu G.**

**Cell Death & Disease 2010 Aug 5;1:e61.**



### **ARTÍCULO III: Partial dysferlin reconstitution by adult murine mesoangioblasts is sufficient for full functional recovery in a murine model of dysferlinopathy.**

#### **Hipótesis:**

El trasplante de mesoangioblastos procedentes de un ratón sano adulto es una terapia celular efectiva en el modelo murino de disferlinopatía A/J SCID.

#### **Resultados:**

##### ***Mesoangioblastos murinos: aislamiento y caracterización.***

Obtuvimos MABs desde biopsias de músculo de un ratón adulto hembra de la cepa C57BL6 de 2 meses de edad mediante técnicas de cultivo limitante (denominadas de ahora en adelante como mMABS). Estas células tenían características similares a los MABs descritos anteriormente: morfología triangular y rápido crecimiento (doblaban su número en menos de 24 horas). Mediante técnicas de citometría de flujo demostramos la expresión en superficie de los marcadores Sca-1 y CD-44, pero a diferencia de las células satélite, no expresaban ni MyoD ni Pax7 durante la fase de proliferación. Estas células eran capaces de diferenciar a múltiples tejidos mesodérmicos *in vitro* cuando se cultivaban en los medios adecuados, pero a diferencia del resto de MABs diferenciaban de forma espontánea a músculo estriado cuando se cultivaban en medio pobre en factores de crecimiento (DMEM 2% Horse Serum). El índice de diferenciación era elevado, alrededor del 40% de las células expresaban MyoD y formaban parte posteriormente de miotubos maduros. Los mMABs no expresaban disferlina durante la fase de proliferación, pero en cambio, los niveles de disferlina iban aumentando de forma progresiva durante la diferenciación hasta miotubo maduro, momento en el que se podían demostrar una expresión selectiva por parte del miotubo y no de las células

mononucleadas que no habían entrado en el programa de diferenciación miogénica (ver figura 1 del artículo y figuras suplementarias 1 y 2).

### ***Trasplante de mMABs en un modelo murino de disferlina.***

Con la intención de comprobar la capacidad regenerativa de estas células, decidimos en primer lugar realizar un trasplante de mMABs en el modelo murino A/J SCID. Para ello inyectamos 500.000 mMABs, previamente transducidos con un vector lentiviral que expresaba LacZ nuclear, en los músculos cuádriceps y tibial anterior de 7 ratones B6.1/J-*Dysf*<sup>prmd</sup> de 5 meses de edad. Estudiamos de forma secuencial el trasplante. A las 36 horas de la inyección detectamos numerosas células en el músculo, pero rodeadas de células inflamatorias, fundamentalmente neutrófilos, macrófagos CD68+ y linfocitos T CD3+. El infiltrado inflamatorio aumentó progresivamente hasta el día 7 en el que detectamos células inflamatorias no solamente alrededor de las células trasplantadas sino también en puntos lejanos y en las zonas perivasculares. A los doce días pudimos observar fibras musculares que ya contenía núcleos LacZ (que indicaba una fusión de MABs con fibras musculares) que estaban siendo fagocitadas por macrófagos. Finalmente a los 21 días no detectamos ninguna célula nLacZ + en el interior del músculo inyectado (ver figura 2 del artículo).

### ***Caracterización de un ratón knock-out de disferlina con una alteración genética del sistema inmune:***

Dado que se había producido un rechazo agudo del trasplante decidimos utilizar el modelo murino de disferlinopatía inmunosuprimido (cedido por el Dr. Torrente). Este modelo conocido como SCID BL/AJ no posee células B ni T y es así mismo deficitario en disferlina. A los 5 meses de edad no existían diferencias significativas desde un

punto de vista morfológico entre la cepa B6.1/J-*Dysf*<sup>prmd</sup> y la cepa SCID BL/AJ demostrándose cambios distróficos ligeros de forma predominante en los músculos proximales de las extremidades inferiores y un grado similar de fibrosis muscular (ver figura suplementaria 3).

### ***Trasplante de mMABs en un modelo murino inmunosuprimido de disferlina.***

Para comprobar la capacidad regenerativa de las células en este nuevo modelo realizamos el trasplante de dos formas. Por un lado mediante inyección intramuscular de 500.000 mMABs nLacZ<sup>+</sup> en los músculos cuádriceps, tibial anterior y gemelo de 6 ratones SCID BL/AJ de 5 meses de edad (3 de ellos previamente tratados con cardiotoxina). Por otro lado mediante inyección intra-arterial de 500.000 mMABs nLacZ<sup>+</sup> en la arteria femoral derecha de 10 ratones SCID BL/AJ de 5 meses de edad (5 de ellos previamente tratados con cardiotoxina). Dado que este modelo murino no desarrolla una distrofia muscular importante, decidimos aumentar la patología basal muscular para activar el proceso de regeneración muscular facilitando así que los MABs pudiesen fusionar con las fibras residentes. Para ello todos los animales realizaron una hora de ejercicio en el agua, 24 horas antes del trasplante celular. Además, la mitad de los animales en cada experimento recibió cardiotoxina en los músculos cuádriceps, tibial anterior y gemelo. Un mes tras la inyección celular pudimos observar un gran número de fibras musculares que contenían núcleos LacZ positivos en su interior, resultado de la fusión de los mMABS. El número de fibras LacZ positivas era mayor en el caso de la inyección intramuscular, aunque se podían detectar también en los músculos tratados mediante inyección intraarterial (ver figura 3 del artículo). Los estudios de inmunofluorescencia mostraron abundantes fibras musculares que expresaban disferlina, todas ellas contenían asimismo núcleos LacZ positivos en su

interior, lo que indicaba que la expresión de disferlina en las fibras musculares se producía únicamente por la fusión de mMABs no portadores de mutación alguna en el gen de la disferlina (ver figura 4 del artículo). Los estudios de Real Time PCR de los músculos trasplantados mostraron un aumento significativo en la expresión de disferlina comparada con los controles SCID BL/AJ no tratados.

Cuando las células se inyectaron por vía intramuscular los niveles de mRNA de disferlina oscilaron del 17 al 27%, con un máximo del 35% en los músculos pretratados con cardiotoxina, y de un 12 a un 15%, máximo de 28%, en los músculos no tratados con cardiotoxina. La inyección intraarterial única fue suficiente para obtener entre un 9 y un 11% de expresión en los animales pretratados con cardiotoxina (máximo 16%) y un 6 a un 12% en los animales no tratados con cardiotoxina (máximo 18%). Estos resultados se confirmaron por Western-Blot, detectando la presencia de disferlina en todos los músculos tratados fuese cual fuese el método de inyección de las células (ver figuras 3 y 4 del artículo).

### ***Estudio funcional de los animales tratados con un trasplante de mMABs.***

Desde un punto de vista funcional, a pesar de que los animales tratados puntuaron más alto en las pruebas físicas realizadas en el tread-mill, estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Lo mismo ocurrió con la determinación de Ck en sangre periférica (ver figura suplementaria 5 del artículo). Por este motivo decidimos realizar un ensayo funcional microscópico y detectar si la disferlina expresada era plenamente funcional mejorando, de este modo, la capacidad de respuesta ante un daño externo de las fibras musculares. Para ello nos basamos en los experimentos realizados por el grupo del Dr. Campbell usando un láser externo que daña la membrana de las fibras musculares. Inyectamos 500.000 mMABS esta vez marcados con la proteína

fluorescente GFP por vía intramuscular en tibial anterior, el extensor digitorum longus y el gemelo de 4 animales SCID BL/AJ. Al mes de la inyección, aislamos fibras musculares de los músculos trasplantados y las fijamos en placas de cultivo que contenían PBS rico en calcio y el marcador fluorescente FM 4-64. Las fibras musculares fueron irradiadas con un láser para inducir una lesión en la membrana. En este tipo de modelo, el aumento de señal fluorescente en el área perilesional se correlaciona a la inversa con la capacidad de reparación de la fibra muscular. La intensidad de la fluorescencia fue más alta en las fibras obtenidas de ratones SCID BL/AJ no tratados que en la de los animales tratados con mMABS. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas. De forma paralela, no encontramos diferencias significativas entre los animales tratados con MABs y los animales sanos no afectados de una disferlinopatía (ver figura 5 del artículo).

### **Discusión:**

En este trabajo hemos podido demostrar que la terapia celular con MABs es capaz de recuperar la expresión de disferlina en los músculos de animales afectados de una distrofia muscular por déficit de disferlina y que esta proteína es plenamente funcional, recuperando su función de reparación de la membrana de las fibras musculares. Hemos aislado por primera vez MABs desde biopsias musculares de ratones adultos. Estas células comparten muchas características estructurales y funcionales con los MABs previamente descritos, pero a diferencia de los anteriores, son capaces de diferenciarse de forma espontánea a músculo esquelético *in vitro* cuando se cultivan en medios de diferenciación estándar, con un alto índice de diferenciación que llega a ser del 40%. Las mMABs son distintas de las células satélite ya que no expresan CD34, MyoD o Pax7 durante su estado proliferativo.

Tras el trasplante observamos una recuperación parcial de la expresión de disferlina en los músculos tratados. La expresión varió de forma importante en función del método usado, pero en general los niveles más altos se obtuvieron en los experimentos realizados con inyección intramuscular. Cabe decir que tras una sola inyección celular obtuvimos porcentajes de expresión de hasta un 35% comparado con controles sanos. Esta cantidad es similar a la mostrada por portadores de una única mutación en el gen de la disferlina, donde los niveles de expresión en monocitos de sangre periférica oscilan del 20 al 75%. Estos resultados inducen al optimismo ya que una recuperación parcial de los niveles de disferlina en los términos obtenidos en este trabajo, podría ser suficiente para reducir de forma significativa o incluso evitar los síntomas de los pacientes. Los estudios funcionales que hemos realizado nos han permitido comprobar una recuperación completa de la habilidad reparadora de la membrana muscular tras un daño inducido por láser, lo que sugiere que no son necesarios niveles completamente normales de disferlina para poder tener una capacidad reparadora efectiva en el músculo esquelético.

El modelo murino A/J deficitario en disferlina, del que proceden todas las cepas que hemos utilizado en este trabajo, desarrolla una distrofia muscular leve en edades avanzadas, pero que en ningún momento compromete la funcionalidad del animal. Lo mismo ocurre con el modelo B6.1/J-*Dysf<sup>prmd</sup>* generado por el grupo de la Dra. Richard o por el modelo inmunosuprimido SCID BL/AJ generado por el grupo del Dr. Torrente. Este es el motivo, a nuestro parecer, de que la colonización muscular por parte de las células inyectadas (lo que se conoce como *homing*) sea bajo, mejorándose sensiblemente tras la inyección de cardiotoxina. Este mismo hecho también explicaría que no haya diferencias significativas en las puntuaciones obtenidas en las pruebas físicas realizadas por los animales enfermos sin y con tratamiento con MABS y los



controles SCID no deficitarios en disferlina. Esta situación es muy diferente a lo que ocurre en pacientes humanos, donde el déficit de disferlina produce una limitación funcional muy importante y donde, por otra parte, el estudio morfológico muscular revela la existencia de abundantes fibras necróticas y de infiltrados inflamatorios a costa de macrófagos y linfocitos T CD8. Esta actividad inflamatoria podría hipotéticamente mejorar el paso de los MABs hacia el interior de los músculos enfermos, mejorando significativamente los resultados obtenidos en este estudio.

Otro resultado interesante de este trabajo es la respuesta inflamatoria observada tras el trasplante con MABs murinos en el modelos B6.1/J-*Dysf*<sup>prmd</sup>. Estas diferencias no pueden deberse a una incompatibilidad entre las células del donante y el tejido receptor, ya que las células proceden de un ratón BL6/C57, que es la misma cepa que da origen al B6.1/J-*Dysf*<sup>prmd</sup>. En nuestra opinión, existen evidencias de que el déficit de disferlina incrementa de forma notable la capacidad fagocítica de los monocitos que invaden el músculo tras la inyección celular, pero no justifican en todo caso los resultados que hemos obtenido en nuestro trabajo. Cabe tener en cuenta que en ratones con déficit de disferlina se ha descrito una reducción en la expresión de DAF (o CD55), una molécula que impide la correcta activación del sistema de complemento y que inhibe la interacción entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T. El papel que DAF puede tener el rechazo de un órgano tras su trasplante se ha estudiado previamente. Se ha descrito que una expresión reducida de DAF por el órgano trasplantado está relacionado con un rechazo mediado por células T de forma aguda tras el trasplante. Por lo tanto, es posible que se deba utilizar una inmunosupresión permanente en pacientes que reciban el trasplante de MABs.

Decidimos utilizar animales jóvenes en un estadio presintomático con la intención de mejorar los resultados del estudio evitando usar de este modo animales en los que el

proceso distrófico hubiese ya inducido una transformación grasa o de tejido fibroso. Estudios realizados previamente han demostrado que el resultado del trasplante de MABs es peor si se utilizan animales en estadios avanzados de la enfermedad. Gargioli y colaboradores demostraron en 2008 que el trasplante de MABs en ratones con un déficit de sarcoglicano era más eficiente si se pretrataban los músculos con células que secretaban metaloproteinasa-9, capaz de mediar en la destrucción del tejido fibroso, y el factor de crecimiento derivado de placenta, capaz de inducir una angiogénesis del músculo distrófico. Decidimos utilizar animales de 5 meses de edad porque las alteraciones musculares son ya detectables, pero no existe todavía un infiltrado graso o de tejido fibroso. Una de las características más importantes de los MABs es su capacidad para cruzar la barrera endotelial y penetrar en el interior del músculo esquelético en respuesta a diferentes señales inflamatorias. Se ha descrito que la inflamación muscular en el modelo A/J, aparece en fases tardías, es poco importante y limitada a determinados grupos musculares. Este dato sugiere que la cantidad de señal pro-inflamatoria liberada desde los músculos dañados será poco importante. A pesar de todo, los mMABs fueron capaces de cruzar la barrera endotelial, y colonizar el músculo distrófico. El grado de colonización mejoró de forma evidente con el pre-tratamiento de los músculos con cardiotoxina, sugiriendo que la señal inflamatoria producida por el músculo era de mayor intensidad en este caso. La capacidad de las células para cruzar la barrera endotelial es fundamental para que sea posible aplicar esta técnica como terapia de pacientes con distrofia muscular, ya que permite la distribución de las células por todos los músculos tras una única inyección intra-arterial. Existen además diferencias significativas entre los músculos humanos y los de los ratones SCID B1/AJ, como hemos comentado previamente, que hacen suponer que la señal inflamatoria muscular es elevada en músculos humanos. De hecho, la presencia de infiltrados inflamatorios en

las biopsias musculares de los pacientes es frecuente, hasta el punto de que algunos pacientes son diagnosticados de forma errónea de una miopatía inflamatoria. En teoría, esta actividad inflamatoria debería favorecer el paso de los MABs trasplantados hacia el interior del músculo.

En conclusión, hemos demostrado que los mMABs una vez trasplantados al modelo murino de déficit de disferlina SCID/BLAJ, fueron capaces de recuperar la expresión de disferlina hasta niveles suficientes como para dotar a las fibras musculares de una capacidad normal de reparación de la membrana ante lesiones externas. Estos resultados podrían conducir a la realización del primer ensayo clínico con trasplante de MABs en pacientes con un déficit de disferlina.



**ARTÍCULO IV: The increase of pericyte population in human neuromuscular disorders supports their role in muscle regeneration *in vivo*.**

**Díaz-Manera J, Gallardo E, De Luna N, Navas M, Soria L, Garibaldi M, Rojas-García R, Tonlorenzi R, Cossu G, Illa I.**

**Journal of Pathology, 2012, July 30th**



#### **ARTÍCULO IV: The increase of pericyte population in human neuromuscular disorders supports their role in muscle regeneration *in vivo*.**

##### **Hipótesis:**

Los pericitos, células periendoteliales localizadas en los capilares musculares, participan en la regeneración muscular *in vivo* en humanos.

##### **Resultados:**

***Las células AP positivas aisladas desde músculo esquelético expresan marcadores de pericito in vivo e in vitro.***

Los pericitos son células periendoteliales situadas en la periferia de los capilares musculares. Trabajos previos realizados por el grupo del Dr. Cossu sugieren que los mesoangioblastos humanos (MABs) obtenidos de músculo esquelético podrían ser un subtipo de pericitos. El método habitual de obtención de MABs se basa en métodos de *sorting* usando como marcador específico la fosfatasa alcalina (AP). En primer lugar quisimos confirmar que las células AP positivas del músculo expresaban marcadores de pericitos tanto *in vivo* como *in vitro*. Las células AP positivas aisladas desde músculo esquelético expresaban en cultivo los marcadores característicos de pericitos NG2, PDGFR $\alpha$ , SMA, Kir 6.1, endosialin, y RGS5 como fue demostrado mediante inmunofluorescencia (IF), western-blot (WB) o RT-PCR. En cambio no expresaban los marcadores miogénicos MyoD, Myf5, miogenina durante el estado proliferativo. Una vez inducido su diferenciamiento a músculo esquelético mediante cultivo en placas pre-tratadas con Matrigel®, pudimos detectar mediante WB e IF la expresión de los factores de transcripción característicos del proceso miogénico: en primer lugar MyoD y Myf5, seguido de miogenina y disferlina, y en fases finales, coincidiendo con la existencia de

miotubos maduros en el cultivo, fue posible detectar niveles elevados de miosina de cadena pesada. Los estudios in vivo realizados sobre muestras de músculo control nos permitieron evidenciar que la tinción de AP colocalizaba con los marcadores NG2, SMA, PDGFR $\alpha$ - $\beta$  y CD146, marcadores característicos de pericito. Ni las células satélite ni diferentes líneas celulares endoteliales (células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) y células endoteliales de la microvasculatura humana (HMEC) expresaban AP en cultivo. Todos estos resultados permiten confirmar que la expresión de AP es específica de los pericitos en el músculo esquelético humano, como ha sido sugerido en trabajos previos.

### ***La población de pericitos está incrementada en las biopsias de pacientes con miopatías***

En segundo lugar quisimos conocer si el número de pericitos AP+ aumenta significativamente en condiciones patológicas en el músculo esquelético. Dado que no existen datos sobre el número normal de pericitos AP+ en músculo sano, decidimos estudiar en primer lugar este hecho. Para eso obtuvimos, con la colaboración del servicio de traumatología, muestras de diferentes músculos de sujetos sanos que debían intervenir quirúrgicamente, bien por una fractura bien por un proceso ortopédico. En total recogimos 36 muestras de músculo incluyendo 15 tríceps, 16 cuádriceps y 5 bíceps. Confirmamos mediante tinciones rutinarias que las muestras de músculo eran normales. No hubo diferencias significativas entre los tres grupos en cuanto a edad y sexo. Observamos que como media, un 4,7% de los vasos eran positivos por AP (tríceps 5,86%, bíceps 3,12%, cuádriceps 4,18%). Estudiamos otros parámetros de las biopsias, como por ejemplo, el número de fibras musculares, el número de células satélite y el



número total de vasos (ver tabla suplementaria 1 del artículo) sin observar diferencias significativas entre los diferentes grupos de músculos.

El estudio en músculos patológicos se realizó sobre 40 muestras de pacientes afectos de enfermedades primarias musculares (27 pacientes) y primarias del nervio periférico o de la neurona motora (13 pacientes). Comparamos los resultados de los dos grupos con los obtenidos en los músculos controles. Observamos en las muestras procedentes de pacientes con enfermedades primarias musculares un incremento significativo en el porcentaje de vasos AP positivos comparado con controles y con enfermedades primarias neurógenas (9,4% en miógenas vs 5,7% en neurógenas y vs 4,7% en controles, Student T test,  $P < 0,05$ ). Pudimos observar además un aumento significativo en el porcentaje de fibras NCAM positivas (13,1% en miógenas vs 0,1% en controles), un aumento en la ratio de células satélite por fibra muscular (15% en miógenas vs 5,4% en controles) y un mayor número de vasos por fibra (1.6 en muestras miógenas vs 0,99 en controles). Existió una correlación positiva entre el porcentaje de fibras NCAM positivas y el porcentaje de vasos AP positivos en músculo (test de Pearson,  $p: 0,042$ ). Usamos el test estadístico de Dunnet, que permite múltiples comparaciones entre grupos, evidenciando que el aumento más significativo en el porcentaje de vasos AP positivos se podía encontrar en los pacientes afectos de una distrofinopatía (15,2% en estos pacientes vs 4,7 en controles) (ver tabla suplementaria 2 del artículo).

La comparación entre muestras de origen neurógeno y muestras controles mostró diferencias estadísticamente significativas únicamente en el número de fibras NCAM que era estadísticamente mayor en las muestras patológicas (22,6% en neurógenas vs 0,1% en controles). No encontramos en este grupo un incremento significativo en el porcentaje de vasos AP positivos, ni existía correlación entre el número de fibras NCAM y el porcentaje de vasos AP positivos.

### ***Las fibras AP positivas son fibras musculares regenerativas***

En las tinciones realizadas con AP observamos únicamente en muestras patológicas abundantes fibras musculares que eran también positivas por AP. Para determinar el origen de las mismas, estudiamos si expresaban marcadores característicos de fibras regenerativas. Observamos que todas estas fibras eran asimismo NCAM positivas, NG2 positivas y expresaban siempre miosina embrionaria. Un 50% de estas fibras contenían en su interior núcleos MyoD positivos, pero no tan solo situados por debajo de la lámina basal en una situación característica de célula satélite activada, sino también en el centro de la fibra muscular, situación característica de una fibra regenerativa.

### ***Los pericitos son capaces de diferenciar a músculo esquelético in vitro***

El porcentaje de fibras NCAM positivas que eran asimismo AP positivas eran significativamente mayor en el grupo de muestras de origen miógeno que en aquellas de origen neurógeno (miógeno: 12,7%, neurógeno: 4,47%, controles: 0%) siendo la distrofia muscular de Duchenne la enfermedad con mayor número de fibras NCAM positivas/AP positivas (34,1%). Observamos una correlación positiva entre el número de fibras AP positivas, el porcentaje de fibras NCAM positivas y el porcentaje de vasos AP positivos (Test de pearson,  $p < 0.05$ ).

A continuación quisimos confirmar que los pericitos AP positivas eran capaces de diferenciar a músculo esquelético *in vitro* en diferentes condiciones. Para ello, confirmamos las investigaciones previas de que células AP positivas/CD56 negativas aisladas desde músculo esquelético activaban el programa miogénico cuando eran cultivadas en placas pretratadas con Matrigel y diferenciaban a músculo esquelético produciendo miotubos que expresaban miosina de cadena pesada. El índice de

diferenciación varió de muestra a muestra pero la media, después de 8 días en cultivo en medio de diferenciación, fue del 42%.

Comprobamos además la capacidad de los pericitos AP positivos de unirse a células satélite y producir miotubos mixtos en co-cultivos. Con la intención de reconocer en todo momento a los pericitos AP positivos, las tratamos con un vector lentiviral que transportaba LacZ nuclear. Cuando realizamos cocultivos de células satélite con pericitos LacZ positivos, observamos abundantes miotubos mixtos, con una proporción de núcleos LacZ que variaba del 10 al 50%. Para intentar reproducir *in vitro* el proceso de regeneración muscular, en el que célula uninucleadas se unen a fibras multinucleadas, realizamos cocultivos de pericitos LacZ positivos con miotubos maduros (6 días de diferenciación) obtenidos a partir únicamente de células satélite. Después de una semana en cultivo pudimos observar miotubos mixtos, pero la proporción de núcleos LacZ era aquí considerablemente menor en este caso, sin que detectásemos más de dos núcleos LacZ+ por miotubo, representando menos del 5% de los núcleos totales (ver figura 6 del artículo).

Estudiamos además si los miotubos expresaban AP. Los miotubos mixtos, que contenían núcleos LacZ positivos procedentes de pericitos AP positivos y núcleos LacZ negativos, procedentes de las células satélite, expresaban AP desde fases iniciales de diferenciación. En cambio, los miotubos obtenidos desde las células satélite eran consistentemente negativos por AP (ver figura 6 del artículo).

### ***Los pericitos de distrofias musculares expresan MyoD in vivo***

Finalmente, estudiamos si el proceso miogénico activado *in vitro* en placas de cultivo podía evidenciarse también *in vivo*. Para ello estudiamos si los pericitos AP positivos expresaban MyoD o Pax7 en muestras control y miopáticas. Pax7 se expresó

únicamente en las células situadas en la periferia de las fibras musculares, por debajo de la lámina basal, en una situación característica de las célula satélite. Sin embargo, pudimos detectar algunas células AP positivas en la pared de los vasos sanguíneos que contenían en su interior núcleos MyoD positivos. Esta situación era altamente infrecuente (1:1000 vasos AP positivos) y solamente presente en biopsias caracterizadas como miopáticas.

### **Discusión:**

En el presente trabajo hemos demostrado que las células AP positivas del músculo esquelético expresan numerosos marcadores propios de los pericitos, incluyendo SMA, NG2, PDGF-Rc $\beta$ , CD146, endosialin, RGS5 y Kir6.1, confirmando por tanto que son en realidad pericitos. Su número aumenta considerablemente en las distrofias musculares, especialmente en la distrofia muscular de Duchenne. Hemos observado que un número importante de fibras regenerativas expresan también AP. De acuerdo con nuestros resultados *in vitro*, los pericitos AP positivos son capaces de unirse tanto a mioblastos inmaduros como a miotubos maduros. Estos resultados sugieren que los pericitos participan en la regeneración muscular *in vivo* en humanos.

Los mesoangioblastos (MABs) humanos son células madre mesodérmicas que pueden obtenerse fácilmente desde músculo esquelético, usando AP como marcador para identificarlas y aislarlas de una población celular mixta usando técnicas de *sorting*. Dado que los MABs poseen la capacidad de fusionar con fibras musculares dañadas y regenerar el músculo esquelético *in vivo* tras su trasplante en modelos animales, nos planteamos si estas células poseían la capacidad de participar en la regeneración muscular *in vivo* en diferentes condiciones patológicas en humanos. Recientemente, Dellavalle y colaboradores han demostrado que los pericitos residentes en músculo

contribuyen al crecimiento muscular y a la regeneración muscular en ratones. Para ello han usado el modelo murino TN-AP-CreERT2 que permite seguir las células AP positivas gracias a la expresión persistente de LacZ en células que expresan o que han expresado AP en algún momento. AP se expresa por las células endoteliales y por los pericitos en ratones, pero solo los pericitos son capaces de participar en la regeneración muscular fusionando directamente con las fibras musculares o a través de su diferenciación a célula satélite. Dado que los experimentos de “lineage cell tracing” o seguimiento de células marcadas genéticamente no es posible en humanos, nos preguntamos si la AP podría ser un buen marcador para estudiar la población de pericitos en el músculo esquelético de humanos. Hemos demostrado que AP se expresa en la pared de los vasos sanguíneos musculares en músculos controles, como había sido ya publicado previamente. Las células AP positivas se localizan de forma adyacente a las células endoteliales y expresan otros marcadores de los pericitos como SMA, NG2, CD146 o PDGFR $\alpha$ . Además hemos demostrado que tanto las células satélite como las endoteliales son negativas para AP. Las células AP aisladas desde músculo esquelético fueron capaces de diferenciar a músculo esquelético in vitro pero también a otros tejidos mesodérmicos como grasa, hueso o músculo liso. Todo lo comentado previamente sugiere que estas células AP positivas son en realidad pericitos.

Encontramos en las biopsias miopáticas una correlación positiva entre el porcentaje de fibras NCAM positivas y el porcentaje de vasos AP positivos, sugiriendo que el número de pericitos se incrementa en aquellas situaciones donde el proceso de degeneración y regeneración muscular está activo. En cambio, no encontramos ninguna correlación entre el número total de vasos y el porcentaje de vasos AP positivos, sugiriendo que el incremento de pericitos no era una mera consecuencia del incremento de vasos sanguíneos. El aumento en el número de pericitos en las distrofias musculares, descrito

aquí por primera vez, está en consonancia con estudios recientes realizados en modelos murinos donde tras una destrucción muscular aguda se demuestra un incremento de células madre mesodérmicas, especialmente pericitos NG2 positivos.

NCAM es una glicoproteína de superficie que se ha relacionado con procesos de reconocimiento intercelular y con mecanismos de adhesión celular. En el músculo normal tan sólo las células satélite expresan NCAM. Las fibras musculares expresan NCAM bajo dos condiciones patológicas diferentes. En las biopsias musculares miopáticas se puede observar una tinción granular en el citoplasma de las fibras musculares regenerativas, habiéndose implicado en los mecanismos de interacción y adhesión entre células satélite y fibras regenerativas. En las biopsias neurógenas, una expresión difusa de NCAM es detectable en las fibras pequeñas anguladas, habiéndose relacionado en estos casos, con los mecanismos de reconocimiento entre los nuevos brotes axonales y las fibras denervadas. En relación con estos datos, nosotros pudimos evidenciar que los pericitos AP positivos no estaban incrementados en las biopsias neurógenas, sin que existiese una correlación positiva entre las fibras NCAM y el porcentaje de vasos AP positivos, indicando que los pericitos no ejercen ningún rol en los procesos patológicos de origen neurógeno.

Las fibras musculares AP positivas fueron descritas en 1970. El origen de estas fibras es un tema de discusión. Nuestros resultados indican que son fibras regenerativas debido a que expresan NCAM y miosina embrionaria y a que es frecuente encontrar núcleos MyoD positivos localizados en el centro de las fibras, derivados probablemente de la fusión de pericitos. Las fibras AP positivas no se identifican en controles, pero son en cambio muy frecuentes en distrofias musculares, miopatías inflamatorias y pueden ser incluso aisladas en casos de atrofia muscular por denervación, como por ejemplo en la ELA. Hemos encontrado una correlación positiva entre el porcentaje de fibras

musculares AP positivas, el porcentaje de fibras NCAM positivas y el porcentaje de vasos AP positivos, exclusivamente en biopsias de origen miopático.

Con la intención de reproducir *in vitro* el proceso de regeneración muscular, hemos realizado diferentes experimentos. En primer lugar, hemos observado como los pericitos AP positivos son capaces de unirse tanto con células satélite como con miotubos *in vitro*, indicando que los pericitos poseen la capacidad de activar el proceso de diferenciación miogénica en respuesta a un proceso regenerativo muscular. En segundo lugar, hemos estudiado la expresión de AP por miotubos recién formados observado una expresión importante en miotubos mixtos que contienen núcleos tanto de pericitos como de células satélite. Sin embargo no hemos detectado AP en aquellos miotubos formados únicamente por células satélite. Estos resultados obtenidos *in vitro* refuerzan la hipótesis de que la expresión de AP por las fibras musculares es dependiente de la fusión de los pericitos.

Hay evidencias sobre la interacción de células satélite y pericitos publicadas recientemente. Desde un punto de vista anatómico se ha demostrado que las células satélite se sitúan de forma cercana a los capilares tanto en músculos controles como en condiciones patológicas. En músculos sanos la lámina basal separa a las células satélite de los pericitos, sin embargo, después de un daño muscular la lámina basal se rompe permitiendo una comunicación directa entre fibras musculares regenerativas y células madre perivasculares, como por ejemplo los pericitos, que pueden guiar a estas células a activar el proceso de diferenciación miogénica, posiblemente en respuesta a moléculas secretadas por las células satélite. Esta hipótesis explicaría porque la ablación de las células satélite Pax7 positivas en modelos murinos bloquea completamente el proceso de regeneración muscular, sin que sea posible identificar la participación de otras células madre residentes en músculo esquelético bajo esas condiciones. Por otra parte,

en músculo sano es conocido que los pericitos secretan Ang-1, lo que mantiene a las células satélite en estado de quiescencia. En cambio, tras un daño muscular agudo, los pericitos expresan  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ , un factor de transcripción que se ha relacionado con la proliferación y el diferenciación de los mioblastos, y probablemente secreten otros factores que recluten a los pericitos en el proceso de regeneración muscular.

En conclusión, hemos mostrado que la población de pericitos AP positivos está aumentada de forma significativa en las biopsias musculares de enfermedades musculares primarias, especialmente cuando un proceso regenerativo importante se encuentra activo. Este incremento no es una mera consecuencia del aumento en el número de vasos, pero en cambio sí está claramente relacionado con el aumento en el número de fibras NCAM positivas. Los estudios *in vitro* han mostrado que las células AP positivas son capaces de fusionar con miotubos participando en su crecimiento. Además, estudios realizados por otros autores mostraron que células AP positivas trasplantadas en músculos de modelos animales pre-clínicos de distrofia muscular fueron capaces de fusionarse con fibras musculares dañadas participando en la regeneración muscular. Todos estos datos sugieren que además de las células satélite, los pericitos juegan un papel importante en la regeneración muscular en los músculos humanos adultos *in vivo*.



## **DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS**



El objetivo general de esta tesis era profundizar en el proceso diagnóstico y en las diferentes opciones terapéuticas de las diferlinopatías.

El proceso habitual de diagnóstico de una distrofia muscular incluye diferentes aspectos. Por un lado, es fundamental realizar una buena historia clínica, recogiendo los antecedentes familiares de enfermedades neuromusculares que permitan establecer un patrón de herencia claro, y una buena exploración física identificando aquellos rasgos físicos característicos que permitan diferenciar entre las diversas distrofias musculares. En segundo lugar podemos realizar diferentes pruebas diagnósticas que ayuden a identificar de que proceso se trata. Entre ellas destacan la resonancia muscular, la biopsia de músculo esquelético y finalmente los estudios genéticos. El proceso de realización de estas pruebas es largo, costoso y en múltiples ocasiones no es definitivo, ya que muchas distrofias musculares comparten características similares siendo su diagnóstico complejo.

En el caso de las disferlinopatías, el estudio de la expresión de disferlina en monocitos de sangre periférica, permite identificar de forma sencilla a pacientes y a portadores de la enfermedad. Es necesaria simplemente una extracción sanguínea para obtener dichas células, siendo posible obtener el resultado en un período inferior a las 48 horas desde la obtención de la muestra. Tal y como hemos demostrado en esta tesis, existe una correlación positiva entre la expresión de disferlina en músculo y aquella de los monocitos, lo que confiere a esta prueba una utilidad importante en el diagnóstico de la enfermedad, pudiendo ahorrar al paciente la necesidad de hacerse una biopsia muscular. Hemos probado además que cuando se obtiene la biopsia muscular, el estudio de la disferlina mediante IF puede llevar a equívocos, ya que existen otras enfermedades donde se halla una reducción considerable de disferlina en músculo, y además, pueden encontrarse diferentes patrones de expresión de disferlina que van, desde la ausencia

completa, a la detección de fibras con una marcaje punteada en su interior. Realizar un WB de las muestras musculares sirve para confirmar una reducción en la expresión de disferlina y debe siempre realizarse cuando se sospeche la enfermedad como prueba complementaria a la IF. No obstante en ocasiones no se dispone de biopsias muscular o ésta es muy pequeña o se encuentra en mal estado. En esos casos, de nuevo el estudio de la expresión de disferlina en monocitos de sangre periférica es de gran utilidad.

Además, los monocitos son una fuente de RNA de disferlina, permitiendo la realización de estudios genéticos para hallar las mutaciones responsables de la enfermedad y que confirmen el diagnóstico de sospecha.

Hemos demostrado además que los monocitos son también de utilidad en la identificación de portadores de una mutación en el gen de la disferlina. Gracias a la realización de este estudio en una amplia muestra de paciente y familiares, hemos podido incluso establecer unos valores que permiten diferenciar pacientes de portadores y de controles sin afectación de la disferlina. Sabemos que una expresión reducida por debajo del 17% se encuentra únicamente en aquellos individuos con dos mutaciones en el gen de la disferlina, una expresión entre el 17 y el 80% es característica de portadores de una única mutación en el gen DYSF, mientras que valores superiores al 80% se encuentran únicamente en individuos sin mutaciones en el gen DYSF. Estos resultados añaden un valor extra al estudio de monocitos, especialmente en el caso de consejo genético de familiares de pacientes con disferlinopatía.

Pero además, hemos demostrado que el estudio de expresión de disferlina en monocitos es útil como seguimiento en casos de ensayos clínicos en los que el objetivo sea aumentar la expresión de disferlina. En este sentido hemos realizado un ensayo clínico con vitamina D3 en portadores de una única mutación en el gen DYSF, demostrando un

incremento significativo en la expresión de disferlina en monocitos tras un año de tratamiento.

Uno de los problemas de estos estudios es la necesidad de una muestra control con la que comparar el resultado obtenido en el sujeto a estudio. En la consulta diaria obtenemos muestra de acompañantes no emparentados de los pacientes, pero son numerosas las ocasiones en que esto no es posible, siendo necesario entonces buscar otros voluntarios. Por este motivo, hemos buscado y encontrado un modelo celular que pueda substituir a los monocitos de sangre periférica. En la presente tesis hemos demostrado que el tratamiento de células HL60 con vitamina D3 promueve su diferenciación a monocito maduro activando la expresión de disferlina hasta niveles similares a los obtenidos de controles humanos, permitiendo su uso en tareas asistenciales. Hemos demostrado que la vitamina D3 es capaz de incrementar la expresión de disferlina por estas células, incluso cuando se inhibe su diferenciación a monocito. Para ello utiliza dos vías diferentes, una directa por la que el receptor de la vitamina D3 de membrana activado se desplaza al interior del núcleo, uniéndose al promotor del gen DYSF y activando su expresión, y otra indirecta a través de la cascada MAPK/ERK. El tratamiento con vitamina D3 aumenta la expresión de disferlina también en mioblastos y miotubos de pacientes portadores de una única mutación en el gen DYSF. Pero además, como hemos comentado previamente, aumenta la expresión de disferlina *in vivo* en humanos, como hemos demostrado mediante un ensayo clínico randomizado en el que 17 sujetos fueron tratados durante un año con vitamina D3. Estos datos son de interés, ya que el uso de la vitamina D3 como terapia coadyuvante a terapias génicas realizadas con la intención de solucionar la mutación de uno de los dos alelos afectos en pacientes (por ejemplo exón-skipping) puede aumentar la expresión de disferlina muscular.

En esta tesis hemos también profundizado en otras terapias, además de la vitamina D3. La terapia celular representa una posible opción terapéutica futura en las distrofias musculares. Los últimos avances realizados muestran a los mesoangioblastos, células madre de origen mesodérmico, como el modelo celular más interesante para la realización de ensayos clínicos. Por este motivo decidimos explorar si estas células podrían ser de utilidad en un modelo preclínico murino de distrofia muscular por déficit de disferlina. Aislamos y caracterizamos por primera vez MABs desde músculos murinos adultos de un ratón sano de la cepa C57/BL6. Estas células poseían las mismas características que MABs embrionarios murinos, MABs caninos o humanos, especialmente su capacidad de diferenciar de forma espontánea a músculo esquelético *in vitro* y su capacidad de atravesar la barrera endotelial y difundir por el músculo enfermo una vez inyectados en el torrente sanguíneo mediante inyección intraarterial. Tras su inyección en ratones deficitarios en disferlina, hallamos abundantes fibras musculares que expresaban disferlina de nuevo en la membrana muscular, evidenciando un incremento significativo en la expresión de disferlina en los músculos tratados mediante Real-Time PCR y Western-Blot. Esta nueva disferlina era plenamente funcional ya que realizamos estudios de daño de membrana en fibras musculares aisladas de los músculos tratados y observamos una completa recuperación en la capacidad de reparación de la membrana muscular. Estos resultados permiten plantear la hipótesis de que los MABs puedan convertirse en un futuro cercano en una opción terapéutica en pacientes afectados de un déficit de disferlinopatía. Estos experimentos nos llevaron a preguntarnos si los mesoangioblastos participaban *in vivo* en el proceso de regeneración muscular en humanos. Estudios realizados previamente sugieren que los pericitos son la contrapartida *in vivo* a los mesoangioblastos. En esta tesis hemos demostrado que los MABs humanos obtenidos

mediante la expresión de AP son en realidad pericitos, ya que expresan numerosas moléculas características de los mismos. Hemos evidenciado que estas células poseen capacidad miogénica *in vitro* por si solas, pero también cuando se cultivan conjuntamente a células satélite o miotubos maduros, participando en el proceso de crecimiento muscular *in vitro*. Nuestros estudios *in vivo* han mostrado que el número de pericitos está incrementado de forma notable en las biopsias musculares de pacientes con distrofias musculares, correlacionándose este incremento con la presencia de un proceso degenerativo/regenerativo activo, como es el propio de las distrofias musculares. Hemos detectado pericitos que expresan marcadores propios de diferenciación a músculo esquelético situados todavía en la pared de los vasos sanguíneos en condiciones patológicas. Hemos mostrado que la expresión de AP por las fibras musculares indica que se trata en realidad de fibras regenerantes. Además, estudios *in vitro* han mostrado que la expresión de AP por el miotubo es dependiente de la fusión de pericitos. Todos estos datos nos permiten plantear un escenario en el que una distrofia muscular en la que el proceso de degeneración/regeneración se encuentra activo, una serie de señales liberadas bien por las fibras musculares bien por las células satélite, promueven la proliferación de los pericitos vasculares e inducen su diferenciación hacia músculo esquelético, pudiendo entonces fusionar con fibras musculares dañadas y participar de este modo en la regeneración muscular *in vivo*.





## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES:

- 1. La cuantificación de disferlina en los monocitos de sangre periférica es un test útil para el diagnóstico de distrofia muscular por mutaciones en DYSF y para su diagnóstico diferencial con otras distrofias musculares, porque: a)**

La cuantificación de la expresión de disferlina en los monocitos de sangre periférica correlaciona con la del músculo esquelético, mediante Western-Blot tanto en los pacientes con disferlinopatía como en los controles y b) La cuantificación de la expresión de disferlina en monocitos de sangre periférica diferencia entre pacientes afectados de una disferlinopatía (20% expresión), portadores de una única mutación (20-80% expresión) en el gen DYSF e individuos sin mutación en el gen DYSF (>80% expresión). El test sanguíneo será además muy útil en los estudios familiares y también en aquellos de seguimiento sin necesidad de efectuar biopsias de repetición.

- 2. La vitamina D3 activa la expresión de disferlina *in vitro* e *in vivo* y podrá ser utilizada como terapia coadyuvante de la terapia celular o génica, porque:**

1) La Vitamina D3 es capaz de activar la expresión de disferlina mediante dos vías, una directa génica mediada por el receptor de superficie de la vitamina, y otra indirecta, a través de la activación de la cascada MAPK/ERK. 2) Las células HL60 tratadas con vitamina D3 diferencian a monocito expresando niveles de disferlina similares a los obtenidos en individuos control, lo que los convierte en una herramienta útil para el test de la disferlina en estas células y 3) El tratamiento con vitamina D3 a largo plazo de individuos portadores de una

mutación en el gen DYSF aumenta de forma significativa la expresión de disferlina.

**3. Los mesoangioblastos derivados de músculo se utilizarán para efectuar terapia celular en las distrofias musculares por mutación en DYSF, porque:**

1) Estas células obtenidas desde músculos de ratones adultos poseen características similares a mesoangioblastos de otro origen destacando especialmente su capacidad de diferenciación a músculo esquelético tanto *in vivo* como *in vitro*. 2) El resultado del trasplante de mesoangioblastos en un modelo murino de disferlinopatía ha demostrado la restauración de la expresión de disferlina por parte de las fibras musculares y además la recuperación de su capacidad de reparación de la membrana muscular.

**4. Los pericitos participan en la regeneración muscular *in vivo*, porque:**

1) mesoangioblastos humanos aislados desde biopsias musculares son en realidad pericitos, células periendoteliales con marcada capacidad regenerativa. 2) La población de pericitos aumenta considerablemente en las distrofias musculares. 3) los pericitos son capaces de activar el programa de diferenciación a músculo esquelético *in vitro*, formando miotubos maduros, tanto cuando se cultivan por si solos como cuando se co-cultivan con mioblastos unicelulares como con miotubos maduros. 4) Los pericitos del músculo esquelético activan el programa de diferenciación a músculo esquelético *in vivo* en las biopsias musculares. 5) Las fibras AP positivas detectadas en las biopsias musculares de diferentes distrofias musculares son muy probablemente fibras regenerativas procedentes de la fusión de pericitos.

## **RESUMEN EN INGLES DE LA TESIS DOCTORAL**



## **1. Introduction**

### **Dysferlinopathies:**

Dysferlin is a muscle protein localized in the membrane that is thought to be involved in the process of membrane repair after damage. A deficiency in this protein, produced by mutations in the gene DYSF, has been associated with muscle dystrophy. Classically, four phenotypes have been associated to dysferlin deficiency: limb girdle muscular dystrophy (LGMD-2B), distal posterior myopathy or Miyoshi myopathy, distal anterior myopathy, and hyperckemia. In recent years, two further phenotypes have been described: a congenital myopathy and a rigid spine-like syndrome.

Disease onset is usually during adolescence or early adulthood. Patients develop a slowly progressive weakness affecting muscles in lower and upper limbs. Although few studies of the natural history of the disease have been performed, it seems that all patients present severe ambulation problems 20 to 30 years after the onset of the symptoms, requiring a cane to walk or being wheelchair bound. There is as yet no curative treatment at present for dysferlinopathies.

### **Dysferlinopathies: diagnostic algorithm.**

The diagnostic algorithm of muscle dystrophies includes some complementary tests, such as blood analysis, skeletal muscle MRI and muscle biopsy. In the case of dysferlinopathies, some characteristic changes in these tests can help neurologists in the diagnosis.

**Blood creatine kinase (Ck)** levels are high in all patients, with values ranging from 35 to 200 fold increases as compared to control values (9).

Radiological studies, especially **muscle MRI** scans, are useful because they show a characteristic, though non-specific, pattern of muscle involvement. In pre-symptomatic patients, a hyperintense signal in the adductor muscles and medial *gastrocnemius* is commonly observed in the STIR enhanced sequences. In a paper published some years ago, our group described a progressive pattern of involvement observed in symptomatic patients. The first muscles involved are the gastrocnemius and adductor muscles, followed by the *soleus* and *quadriceps*, with later involvement of the posterior muscles of the thigh (*semitendinosus*, *semimembranosus* and *biceps cruralis*) and anterior muscles of the legs (*peroneus* and *tibialis anterior*). Two muscles, *gracilis* and *sartorius*, remain uninvolved throughout the course of the disease (10).

**Muscle biopsy** is commonly used in the diagnosis of muscles dystrophies.

Dysferlinopathies present a dystrophic pattern that consists of central nuclei, increased variability in muscle fibre size, presence of degenerative and regenerative muscle fibres, and increased fatty and fibrous tissue. In dysferlinopathies, inflammatory infiltrates composed of CD4+T cells and macrophages can be found surrounding necrotic fibres or spread over the muscle biopsy (11). Using immunofluorescence, dysferlin can be found in the membrane of muscles fibres by means of specific antibodies. In the case of patients with a dysferlinopathy, three main patterns of expression have been described: complete absence of signal, a granular cytoplasmatic signal, and a patchy positive signal in the membrane of isolated fibres (12). However, immunofluorescence is unspecific, as these abnormal patterns of dysferlin expression have also been described in patients with other types of muscle dystrophy, such as caveolin-3 or calpain-3 deficiency (13, 14). Western-blot (WB) is a more specific technique, because it shows that dysferlin expression is only reduced in patients with dysferlinopathy (15).



Another useful diagnostic tool for dysferlinopathies is the study of **dysferlin expression in monocytes**. Normal monocytes express dysferlin, and they can be easily isolated from peripheral blood thanks to the expression of CD14 in the cell membrane. This study of monocytes is performed using WB. In the case of dysferlinopathies, monocytes show a severe reduction of expression or absence of dysferlin (16). Monocytes are also useful because they provide mRNA to perform genetic studies (17).

**Genetic tests** are used to confirm the diagnosis. However, study of the DYSF gene is challenging for several reasons. One reason is the length of the gene: the DYSF gene contains more than 150,000 base pairs that codify a cDNA of 7 kb. There are 14 different isoforms described expressed in different tissues (18). Another problem is that there are no hot spots in the gene, and mutations have been described all over the gene. To date, 300 hundred different mutations have been described; 82.7% of these affect exons, whereas 17.8% affect introns (18). Studies are generally performed using mRNA that can be obtained from different tissues, including skeletal muscle or peripheral blood monocytes.

#### **Dysferlin: protein structure and function**

Dysferlin belongs to a family of proteins known as ferlins. All ferlins are type II proteins characterized by the existence of a C-terminal domain located outside of the muscle membrane while most of the protein and the N-terminal domain are located inside the fibre, in the cytoplasm (19). Dysferlin contains 7 different C2 domains. To date, only the function of the first domain, the C2A domain, has been clearly defined; C2A is able to bind phospholipids in the presence of calcium (20).

Dysferlin is expressed in several tissues, including skeletal muscle and monocytes (21).

In muscles fibres, dysferlin is located in the muscle membrane. Studies performed in C2C12 myotubes show that it is also expressed in the T tubules (22).

The function of the protein has been studied in several models, including cell culture and animal models. However, the exact role of dysferlin has not been completely established and it seems that it may participate in several processes. *In vitro* studies performed on cell cultures of human myoblasts suggest dysferlin may play a role in myogenesis (12). Although dysferlin deficient myoblasts have been able to produce myotubes, these myotubes present many structural abnormalities, particularly disorganization of the myofibrils and the presence of abundant subsarcolemmal lysosomes (12). Another finding supporting a role of dysferlin in myogenesis is that satellite cells express dysferlin shortly after activation, as has been demonstrated in studies performed on skeletal muscle biopsies from dystrophic patients (12).

Evidence for a role of dysferlin in membrane repair has been found in several studies (23, 24). For example, several functional studies have shown that dysferlin deficient skeletal muscle fibres are unable to repair the membrane after external damage (24, 25).

It has also been postulated that the ability of the C2A domain to bind phospholipids suggests that dysferlin is able to bind intracytoplasmatic vesicles and participate in their fusion with the muscle membrane (23). Furthermore, the presence of vesicles beneath the sarcolemma in patients with a dysferlinopathy suggests dysferlin is involved in the fusion of vesicles with the membrane (26). Moreover, it has been demonstrated that dysferlin interacts with many proteins that are also related to vesicle transport, such as caveolin-3, calpain-3, AHNAK, annexins I and II, and mitsugumine 53 (MG-53) (13, 27, 28).

Based on this evidence a hypothetical model has been formulated for the function of dysferlin. It is already known that a massive influx of calcium into the muscle fibre is produced after an injury in the muscle membrane. It has been proposed that this increase in calcium concentration triggers the binding of dysferlin to intracytoplasmic vesicles, favouring their displacement to the membrane to act as a patch and seal the muscle membrane disruption (19).

### **Dysferlinopathies: pathogenesis**

Based on dysferlin function, the main hypothesis about the pathogenesis of dysferlinopathies is a defect in the ability of muscle fibres to repair membrane. It is known that lesions in the membrane produce an influx of calcium into the cytoplasm of the muscle fibres. This increase in intracellular calcium concentration is harmful to the muscle fibre: it activates proteases, such as calpains, that disrupt many proteins and, moreover, it induces a mitochondrial dysfunction, blocking the cell's production of energy (29).

However, other factors have been related with the pathogenesis of the disease. Some authors defend the hypothesis that the absence of dysferlin in peripheral blood cells, including neutrophils and monocytes, changes the normal function of these cells. It is well known that, neutrophils invade the muscle following acute muscular damage, secreting enzymes such as elastases and other cytotoxic enzymes that favour phagocytosis of muscle debris and necrotic fibres by macrophages (30). Experiments performed in dysferlin knock-out mice showed that necrotic fibres persist in muscles treated with cardiotoxin. It is thought that dysferlin can participate in the secretion of enzymes by neutrophils, through fusion of internal vesicles to the membrane (31). Results observed in mice suggest that dysferlin deficient neutrophils are unable to

release their products when they invade the damaged muscle, impairing the process of muscular regeneration (31). Moreover, it has been suggested that dysferlin deficient monocytes have an enhanced phagocytic activity (32). The fact that macrophages can be found in biopsies of dysferlin deficient patients suggests a possible role of these cells in the pathogenesis of the disease. Nevertheless, the recent description of a new murine model that expresses dysferlin exclusively in muscle fibres, not in any other tissue or even blood cells, did not show cell infiltrates in the muscle biopsies (33).

Other possible pathogenic pathways have been related with the process of muscle degeneration in dysferlinopathies. It has been suggested that the complement cascade is activated in muscles of dysferlinopathy patients, because the MAC complex, the final pathway of the cascade, has been found deposited in the surface of muscle fibres (34). Moreover, several authors defend that dysferlin deficient muscle fibres secrete pro-inflammatory molecules that have several functions, such as activation of the complement cascade, or recruitment of inflammatory cells. In support of this hypothesis, thrombospondin-1 - a pro-inflammatory molecule able to recruit monocytes from peripheral blood to the skeletal muscles - has been shown to be released by dysferlin deficient muscle fibres.

### **Muscle regeneration:**

Muscle regeneration after acute damage consists of two well-organized processes: clearance of necrotic fibres and muscle debris by inflammatory cells, and fusion of myogenic precursors with damaged fibres.

It has been known for more than a century that skeletal muscle can self-repair after damage. In 1961, Dr. Mauro described the presence of mononuclear cells located outside the muscle membrane but beneath the basal lamina, and called them satellite

cells (SC) (35). SC are currently considered the main protagonist of muscle regeneration, but other cells with myogenic potency have been described, such as mesoangioblasts and adipose derived stem cells (36).

It is known that in normal adult skeletal muscles, quiescent satellite cells are located under the basal lamina and express specific markers as PAX7 and MYF5 (37, 38). After acute muscle damage, molecules such as hepatic growth factor, fibroblast growth factor, and insulin growth factor or nitric oxide are released by damaged muscle fibres or by infiltrating cells and activate SC (36). Once activated, SC divides into two different cells: one returns to a quiescent state, continues expressing Pax7, and secures maintenance of the SC pool; the other switches off Pax7, activates the expression of MyoD and Myf5, and continues proliferating. These latter cells are known as myoblasts, and they repair muscle either through direct fusion with damaged muscle fibres or through the formation of new fibres (39).

#### **Inflammatory response to muscle damage:**

After any acute damage to the muscle, damaged fibres and muscle debris must be cleared out to allow SC to proliferate and fuse with damaged fibres. Inflammatory cells perform this process. Soon after the muscle damage occurs, neutrophils invade the muscle and release proteases and free radicals that destroy the extracellular matrix and the damaged muscle fibres (40). Moreover, neutrophils secrete cytokines that recruit macrophages with pro-inflammatory activity from blood (41). Twenty-four hours after muscle damage, macrophages become the main inflammatory cells infiltrating the skeletal muscle. These cells, known also as M1 macrophages, have a pro-inflammatory role and once in the muscle, they phagocytose the necrotic muscle fibres (42). When all damaged muscle fibres have been removed, a second group of macrophages, known as

M2 macrophages, invade the muscle (43). These cells, that have an anti-inflammatory role, have been suggested to promote muscle regeneration. It has been reported that the switch from the pro-inflammatory phenotype to the anti-inflammatory phenotype matches the differentiation of myoblasts. When M1 macrophages invade the muscle, myoblasts proliferate. In contrast, when M2 macrophages become the main cell in muscle, myoblasts differentiate to skeletal muscle, suggesting that molecules secreted by macrophages can influence the switch from a proliferating state to a differentiating state (42).

All these results come from experiments in which acute damage was induced in murine skeletal muscle. Little is known, however, about what happens during a chronic muscular disease, such as in muscle dystrophy. However, in *mdx* mice (a murine model of dystrophinopathy), M1 macrophages predominate during the early stages of the disease, while M2 macrophages are the main muscle-invading cell in later stages (44).

### **Other myogenic progenitors**

In the last 15 years, myogenic potency has been observed in cells other than satellite cells. Myogenic progenitors have been observed among hematopoietic, mesoderm and ectoderm-derived cells.

### **Hematopoietic stem cells**

In 1998, Dr. Ferrari and collaborators reported the finding of LacZ positive fibres in muscles pre-treated with cardiotoxin of *Scid/bg* mice that received a bone marrow transplant from C57/nLacZ mice (45). The existence of myogenic precursors in the bone marrow was also shown in humans by Dr. Gussoni, who reported the presence of muscle fibres expressing paternal dystrophin in a Duchenne patient who received bone

marrow transplantation from his father (46). However, all the experiments with bone marrow transplantation performed in *mdx* mice were unsuccessful because although a few dystrophin positive fibres were observed, no significant functional changes were demonstrated (47).

Soon after the above studies, side-population cells (SP) were identified as the main myogenic cell present in the bone marrow. These cells were not labelled by Hoechst-3333 and expressed the surface markers CD-45 and Sca-1 (48). They were able to participate in muscle regeneration when injected into dystrophic or injured muscles. However, experiments performed in *mdx* mice with transplantation of SP cells failed: less than 1% of the fibres expressed dystrophin after the injection, without any significant functional change (49). SP cells were isolated from several tissues, including skin, heart or skeletal muscle. In skeletal muscles, CD45/Sca1+ cells are located near the small vessels and easily isolable using sorting techniques (50). These cells, like their counterpart from blood marrow, are able to participate in skeletal muscle regeneration when injected into damaged muscles.

Dr. Torrente described another bone marrow resident myogenic stem cell that expressed the CD133 marker in the surface. These cells were isolable from peripheral blood but also from skeletal muscles. In both cases, cells differentiate into skeletal muscle when injected into the *mdx* mice (51, 52).

#### Mesenchyme stem cells:

Mesenchyme stem cells were first described in 1974 by Dr. Friedenstein as a cell population adherent to plastic able to produce cell colonies (53). As the appearance of the cells was similar to fibroblasts, they were known as colony-forming unit-fibroblasts (CFU-f). These cells are able to differentiate *in vitro* to many mesenchyme tissues

including fat, bone and cartilage. In recent years, several types of mesenchyme stem cells have been isolated from different tissues such as skin, bone marrow, or skeletal muscle (54). These cells are, at present, attractive candidates for cell therapy in muscle dystrophies because they are easily isolable from tissues, they grow quickly in standard proliferation culture mediums, and they differentiate to skeletal and cardiac muscles. However, although their myogenic capacity has been demonstrated both *in vitro* in culture and *in vivo* after transplantation in damaged muscles, it is not known whether they participate in the normal muscle regeneration process in human skeletal muscles. Several types of mesenchyme stem cells have been found in skeletal muscles, including myo-endothelial cells, pericyte-like cells and mesoangioblasts. In the present thesis we focalize in mesoangioblasts, as this is the cell model we have been working on.

### **Mesoangioblasts**

Mesoangioblasts (MABs) are mesenchyme stem cells discovered in the late 1990s by Dr. Cossu in Milano (Italy) in the dorsal wall of the embryonic aorta (55). These cells are to differentiate into many mesenchyme tissues both *in vitro* and *in vivo* including smooth muscle, bone, cartilage, fat, heart and skeletal muscles. Embryonic MABs express hematopoietic and endothelial markers such as CD34, Flk1, Pax3, Sca-1, VE-cadherin or MEF-2C but do not express any myogenic marker such as MyoD or Myf5. When injected into the bloodstream, these cells are able to cross the vessel wall and migrate to the interior of skeletal muscle in response to different inflammatory signals, as for example HMGB-1, a molecule released by necrotic muscle fibres (56). In 2003, the results of the first experiments injecting embryonic nLacZ labelled MABs into the femoral artery of mice lacking alpha-sarcoglycan were reported (57). They showed that MABs colonized the muscles efficiently and that two weeks after the injection, many



LacZ<sup>+</sup> muscle fibres were observed expressing alpha-sarcoglycan in their membrane. Moreover, LacZ positive mononuclear cells were also found beneath the basal lamina and outside the muscle membrane in a position characteristic of satellite cells. LacZ<sup>+</sup> cells were also found in the vessel wall of the capillaries and small vessels of the muscles, expressing smooth muscle actin, suggesting that they were also able to differentiate to smooth muscle cells *in vivo*. Treatment with MABs produced a significant morphological improvement consisting of the reduction of necrotic areas, less fibrotic tissue and lower cellular infiltrates. From a functional point of view, isolated single fibres from treated skeletal muscles showed improved specific force and maximum shortening velocity and treated mice performed the physical tests rotarod and treadmill more efficiently.

Soon after these findings, MABs were isolated from muscle biopsies of juvenile dogs (58). These cells were similar to embryonic MABs: they had triangular shape morphology, grew quickly in culture and were able to differentiate to mesenchyme tissue including skeletal muscle when co-cultured with C2C12 cells or when they were transfected with MyoD. Canine MABs were injected into the femoral artery of three Golden Retriever dogs with Duchenne muscle dystrophy. From a clinical point of view, the results were variable. One of the animals was clinically stable throughout the follow-up, another one died suddenly due to a myocarditis, and the third dog remained stable for two months, but worsened quickly thereafter. When the muscle biopsies from all three dogs were analysed, ten to seventy per cent of the muscle fibres expressed dystrophin. Using WB, up to 60% of dystrophin was observed.

MABs were obtained from human skeletal muscles for the first time in 2007 (59). The cells are very similar to previously isolated MABs, although some differences are observed. First, they had reduced expansion ability, with a maximum of 20 passages

before they adopt a flattened morphology and enter in senescence. Second, they need a special culture medium to grow correctly. Third, they express pericyte specific markers such as vimentin, desmin, SMA, PDGF-Rc $\beta$ , alkaline phosphatase and NG2 but they do not express any endothelial cell marker (CD31 or CD34) or other myogenic markers such as NCAM, M-cadherin, MyoD, Myf5 and Pax7 except Pax3. As they express high levels of alkaline phosphatase (AP), this marker is used to isolate the cells from muscle biopsies using sorting. In fact, almost 3% of the cells obtained after disaggregating fresh skeletal muscle biopsies are AP positive and CD56 negative (CD56/NCAM is a specific marker of satellite cell). The AP+/CD56- population is able to differentiate to skeletal muscle *in vitro* producing long mature myotubes when they are cultured over matrigel-coated dishes. Depending on the clone, 40 to 70% of cells differentiate into myotubes. AP positive cells are located in a periendothelial situation when studied in muscle biopsies, in a position characteristic of pericytes, closely located to CD31 positive cells (endothelial cells). AP positive cells are also able to differentiate to skeletal muscle *in vivo*, after being transplanted into dystrophic animals. In animal studies, it has been shown that one month after the injection of human MABs into the femoral artery of *mdx* mice, abundant muscle fibres expressing human dystrophin can be observed in the muscle biopsies. The animals also improves from a functional point of view, as is demonstrated by exercise-induced tests, such as rotarod and treadmill.

All these results have led to the first clinical trial - now underway in Milan – that involves the injection of human MABs in patients with Duchenne muscular dystrophy. Based in the fact that MABs are probably pericytes and that these cells have a myogenic potency when injected into dystrophic muscle, Dellavalle and collaborators investigated whether pericytes participate in normal muscle regeneration *in vivo* (60). They used the TNAP-Cre-ERT2 murine model. In this model, AP muscle cells express LacZ. They

observed that many muscle fibres were LacZ positive after muscle damage was induced using cardiotoxin or after crossing this murine model with the alpha-sarcoglycan deficient mice. These data suggest that pericytes participate in muscle regeneration in mice.

### **Cell therapy in muscular dystrophies: experience in humans.**

The aim of cell therapy is to substitute an ill tissue for a healthy one through the transplantation of donor-derived cells. Muscular dystrophies are among the most difficult diseases to treat for many reasons: skeletal muscle is the most abundant tissue of the body and it is composed of large multinucleated fibres whose nuclei cannot divide. Consequently, any cell or gene replacement strategy must restore proper gene expression in hundreds of millions of post-mitotic nuclei, which are embedded in a highly structured cytoplasm and surrounded by a thick basal lamina. Moreover, as muscle dystrophies affect all muscles, cell therapy has to be able to repair all the muscles of the body efficiently.

The ideal stem cell for cell therapy in muscle dystrophies must meet certain requirements (61):

- It should be easily isolable from skeletal muscle biopsies obtained from adults.
- It should be easily expanded *in vitro* to obtain a population sufficient to perform a transplant in humans.
- It should have a high capacity of differentiation to skeletal muscle *in vitro*, but especially *in vivo*.
- It should not be able to generate tumors once injected in preclinical animal models of the disease.

-It should be easily manipulated genetically; to raise autologous transplantation with genetically corrected cells.

-It should be able to cross the vessel wall, in order to facilitate the systemic diffusion of the cells after intravenous or intra-arterial injection.

As satellite cells are considered the main protagonist in muscle regeneration *in vivo*, these cells were first used as stem cells for transplantation in patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD). In 1990, Law and colleagues injected 8 million myoblasts in the *extensor digitorum brevis* of a 9-year-old patient (62). The cells were isolated from a muscle biopsy from his father. Ninety-two days after the injection, the expression of dystrophin was demonstrated using IF and WB. This first trial was followed by many others, in which a different amount of cells was transplanted using direct intramuscular delivery (36). Although the first results were encouraging, no significant changes from a functional point of view were detected in the muscles treated, and the studies were practically abandoned. Myoblasts have some advantages as stem cells: they are easily isolable from skeletal muscle biopsies, they grow quickly *in vitro*, and they differentiate effectively to skeletal muscle. But they are unable to cross the vessel wall, making systemic injection impossible. Moreover, once in the muscle they do not spread, remaining concentrated near the injection point. In order to use myoblasts to treat a large muscle such as a quadriceps, thousands of injections should be performed, covering the entire muscle surface. Another problem regarding myoblasts is that most cells die in the first 72 hours after the injection, probably due to the poor conditions of the muscle treated, characterized by an increase in the fibrous tissue and the low concentration of oxygen and nutrients.

Although other myogenic progenitors have been described, only two types of cells have been tried in patients with muscle dystrophy. In view of the good results obtained with CD133+ cells, Dr. Torrente and collaborators performed an auto-transplant of CD133+ cells through the intramuscular injection in the *Adductor digitorum brevis* of patients with a DMD (63). Their trial served as an assay for future transplants in patients, demonstrating that the whole process, from the isolation of cells to their injection, was safe. Patients were followed up for 6 months and did not experience any relevant secondary event. As mentioned earlier, the group of Dr. Cossu is now performing a phase II trial of transplantation of MABs in 5 patients with a DMD. The results are expected to be published in 2013.

#### **Dysferlin deficient animal models: clinical description and therapies applied**

The two main preclinical murine models of the disease are A/J mice and SJL mice (64, 65).

SJL mice: this model harbours a mutation in the DYSF gene that disrupts its normal splicing. The final protein lacks the C2E domain that is highly conserved in the ferlin family of proteins, reducing the expression of dysferlin, not more than 15% compared to controls (64). This model is highly susceptible to many induced autoimmune diseases, including experimental encephalitis and inflammatory myositis. The first dystrophic changes are observed at three weeks of life, progressing during the following months. At 7 months of life, the classical dystrophic changes are easily observed in all the muscles, associated with prominent inflammatory infiltrates and abundant necrotic fibres (66). These histological changes produce weakness in proximal muscles that can be clearly detected at 6 months of age.

A/J mice: this model harbours a retrotransposon at the 5' terminal of the gene. Dysferlin is not detected in any tissue. Different to SJL mice, the A/J mice do not experience any problem until late in their lives. The first histological changes are observed around 5 months of age; they affect the diaphragm and the proximal muscles of the legs. As in SJL, inflammatory infiltrates are seen in the biopsies. From a functional point of view, they never experience severe functional changes. Only late in life may they have some troubles performing physical exercises. Due to the absence of a good control to compare A/J mice, these mice have recently been crossed with the C57/BL6 mice. The new strain, known as C57 B6.1/J-*Dysf*<sup>prmd</sup>, has the genetic background of C57/BL6 animals except for the presence of the retrotransposon in the DYSF gene. These animals have been characterized and no major differences with the A/J mice have been observed (66).

#### **Cell therapies on dysferlin deficient animal models**

In 2002, the group of Dr. Tremblay published the results of the transplantation of healthy murine myoblasts in the *Tibialis Anterior* of 2-month-old SJL/J mice previously treated with notexin to increase the damage present in the muscles. One month after the injection, up to 30% of the muscle fibres expressed dysferlin. These results were confirmed using WB, but the authors did not perform any functional study with the animals treated (67).

In 2004, Dr. Brown and colleagues transplanted human cord vein cells using intravenous injection in 6 weeks old SJL/J mice (68). The animals were analysed 12 weeks after treatment and it was observed that less than 1% of the muscle fibres expressed human dysferlin in the membrane. In their paper, the authors discussed that although the myogenic potency of human cord vein cells was demonstrated, the amount

of muscle fibres expressing dysferlin was too low to achieve any significant functional change.

In 2008, Dr. Zatz reported the results of transplantation of human adipose-derived stem cells in two-month-old SJL/J mice through intravenous injection (69). Six months after the injection, the animals were analysed. Dysferlin expression was 14-26% compared to controls using Real Time PCR. More than 50% of the muscle fibres expressed human dysferlin. These changes correlated with a better functional situation since the animals performed all the physical tests better than non-treated animals.

#### **Gene therapy for dysferlin deficient animals:**

The main problem for gene therapy in dysferlinopathies is the large size of the DYSF gene. No vector is able to carry such a large amount of DNA at present. For this reason, other strategies have been designed.

In 2010, Dr. Levy's group published the results of an experiment in two C57 B6.1/J-*Dysf<sup>prmd</sup>* mice (70). They treated the animals with an adeno-virus associated vector (rAAV) carrying a minidysferlin. The minidysferlin was constructed based on the mutation found in a patient who lacked 38 exons (from exon 2 to exon 40) and has a mild phenotype. The new mutated protein contained the N-terminal fragment, the two last C2 domains and the C-terminal fragment. The viruses were injected in the *Tibialis Anterior* of the mice. One month after injection, most of the fibres expressed minidysferlin in their membrane. Functional studies performed in isolated single fibres obtained from the treated muscles demonstrated a normal ability to reseal the membrane after a laser-induced damage.

Also in 2010, the group of Dr. Richard described a new technique for introducing the gene into the muscle fibres, known as concatemerization (71). In this technique, two

different rAAV, each carrying half of the gene, were injected into the *Tibialis Anterior* of two-month-old C57 B6.1/J-*Dysf*<sup>prmd</sup> mice. The results were very good since dysferlin was detected in the membrane of many fibres and 59% dysferlin expression was demonstrated using WB. These results were associated with an improved histological situation of the transplanted muscles. Moreover, isolated single fibres from treated muscles were able to repair the membrane after laser-induced damage. In view of these results, a systemic injection was performed using intravenous delivery. Dysferlin was observed in all the muscles of the body, with a maximum expression of 4% when studied using WB.

#### **Therapies assayed in patients with dysferlinopathy**

Some authors have tried different treatments in patients with dysferlin deficient myopathy. Dr. Hattori and collaborators treated two brothers with dantrolene (25 mg/day) and found a decrease in the Cks levels without any significant functional change (72). Dr. Torrente used rituximab in two patients with the disease, observing an improvement in muscle strength in both that lasted 338 days in one patient and 223 days in the other (73).



## Bibliography

1. Klinge L, Aboumoussa A, Eagle M, Hudson J, Sarkozy A, Vita G, et al. New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2010;81(9):946-53. Epub 2009/06/17.
2. Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, Kusaka K, Nishino H. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain : a journal of neurology*. 1986;109 ( Pt 1):31-54. Epub 1986/02/01.
3. Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, Palmer J, et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Annals of neurology*. 2001;49(1):130-4. Epub 2001/02/24.
4. Paradas C, Gonzalez-Quereda L, De Luna N, Gallardo E, Garcia-Consuegra I, Gomez H, et al. A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2009;19(1):21-5. Epub 2008/12/17.
5. Nagashima T, Chuma T, Mano Y, Goto Y, Hayashi YK, Minami N, et al. Dysferlinopathy associated with rigid spine syndrome. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2004;24(4):341-6. Epub 2005/01/12.
6. Nguyen K, Bassez G, Krahm M, Bernard R, Laforet P, Labelle V, et al. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Archives of neurology*. 2007;64(8):1176-82. Epub 2007/08/19.
7. Bushby KM. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain : a journal of neurology*. 1999;122 ( Pt 8):1403-20. Epub 1999/08/04.
8. Rosales XQ, Moser SJ, Tran T, McCarthy B, Dunn N, Habib P, et al. Cardiovascular magnetic resonance of cardiomyopathy in limb girdle muscular dystrophy 2B and 2I. *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance*. 2011;13:39. Epub 2011/08/06.
9. Amato A, Brown Jr RH. Dysferlinopathies. *Handbook of clinical neurology*. 2011;101:111-8.
10. Paradas C, Llauger J, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, De Luna N, Iturriaga C, et al. Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology*. 2010;75(4):316-23. Epub 2010/06/25.
11. Gallardo E, Rojas-Garcia R, de Luna N, Pou A, Brown RH, Jr., Illa I. Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology*. 2001;57(11):2136-8. Epub 2001/12/12.
12. De Luna N, Gallardo E, Illa I. In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2004;63(10):1104-13. Epub 2004/11/13.
13. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, et al. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Human molecular genetics*. 2001;10(17):1761-6. Epub 2001/09/05.
14. Chrobakova T, Hermanova M, Kroupova I, Vondracek P, Marikova T, Mazanec R, et al. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2004;14(10):659-65. Epub 2004/09/08.

15. Bushby K, Norwood F, Straub V. The limb-girdle muscular dystrophies--diagnostic strategies. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1772(2):238-42. Epub 2006/11/25.
16. Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, Brown Jr RH. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Annals of neurology*. 2002;51(1):129-33. Epub 2002/01/10.
17. De Luna N, Freixas A, Gallano P, Caselles L, Rojas-Garcia R, Paradas C, et al. Dysferlin expression in monocytes: a source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2007;17(1):69-76. Epub 2006/10/31.
18. Blandin G, Beroud C, Labelle V, Nguyen K, Wein N, Hamroun D, et al. UMD-DYSF, a novel locus specific database for the compilation and interactive analysis of mutations in the dysferlin gene. *Human mutation*. 2012;33(3):E2317-31. Epub 2012/01/04.
19. Han R, Campbell KP. Dysferlin and muscle membrane repair. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(4):409-16. Epub 2007/07/31.
20. Posey AD, Jr., Demonbreun A, McNally EM. Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth. *Current topics in developmental biology*. 2011;96:203-30. Epub 2011/05/31.
21. Anderson LV, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human molecular genetics*. 1999;8(5):855-61. Epub 1999/04/10.
22. Klinge L, Harris J, Sewry C, Charlton R, Anderson L, Laval S, et al. Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle. *Muscle & nerve*. 2010;41(2):166-73. Epub 2010/01/19.
23. Therrien C, Di Fulvio S, Pickles S, Sinnreich M. Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. *Biochemistry*. 2009;48(11):2377-84. Epub 2009/03/04.
24. Roche JA, Lovering RM, Bloch RJ. Impaired recovery of dysferlin-null skeletal muscle after contraction-induced injury in vivo. *Neuroreport*. 2008;19(16):1579-84. Epub 2008/09/26.
25. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*. 2003;423(6936):168-72. Epub 2003/05/09.
26. Selcen D, Stilling G, Engel AG. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology*. 2001;56(11):1472-81. Epub 2001/06/13.
27. Benaud C, Gentil BJ, Assard N, Court M, Garin J, Delphin C, et al. AHNK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *The Journal of cell biology*. 2004;164(1):133-44. Epub 2003/12/31.
28. Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH, Jr. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(50):50466-73. Epub 2003/09/25.
29. Wallace GQ, McNally EM. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annual review of physiology*. 2009;71:37-57. Epub 2008/09/24.
30. Roche JA, Lovering RM, Roche R, Ru LW, Reed PW, Bloch RJ. Extensive mononuclear infiltration and myogenesis characterize recovery of dysferlin-null skeletal muscle from contraction-induced injuries. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;298(2):C298-312. Epub 2009/11/20.

31. Chiu YH, Hornsey MA, Klinge L, Jorgensen LH, Laval SH, Charlton R, et al. Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Human molecular genetics*. 2009;18(11):1976-89. Epub 2009/03/17.
32. Nagaraju K, Rawat R, Veszelszky E, Thapliyal R, Kesari A, Sparks S, et al. Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *The American journal of pathology*. 2008;172(3):774-85. Epub 2008/02/16.
33. Han R, Frett EM, Levy JR, Rader EP, Lueck JD, Bansal D, et al. Genetic ablation of complement C3 attenuates muscle pathology in dysferlin-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(12):4366-74. Epub 2010/11/10.
34. De Luna N, Gallardo E, Sonnet C, Chazaud B, Dominguez-Perles R, Suarez-Calvet X, et al. Role of thrombospondin 1 in macrophage inflammation in dysferlin myopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2010;69(6):643-53. Epub 2010/05/15.
35. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1961;9:493-5. Epub 1961/02/01.
36. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(1):11-9. Epub 2010/01/07.
37. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 9):1824-32. Epub 2006/04/13.
38. Tajbakhsh S, Bober E, Babinet C, Pournin S, Arnold H, Buckingham M. Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1996;206(3):291-300. Epub 1996/07/01.
39. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *The Journal of cell biology*. 2004;166(3):347-57. Epub 2004/07/28.
40. Tidball JG, Berchenko E, Frenette J. Macrophage invasion does not contribute to muscle membrane injury during inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 1999;65(4):492-8. Epub 1999/04/16.
41. Nguyen HX, Tidball JG. Expression of a muscle-specific, nitric oxide synthase transgene prevents muscle membrane injury and reduces muscle inflammation during modified muscle use in mice. *The Journal of physiology*. 2003;550(Pt 2):347-56. Epub 2003/05/27.
42. Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, et al. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exercise and sport sciences reviews*. 2009;37(1):18-22. Epub 2008/12/23.
43. Paylor B, Natarajan A, Zhang RH, Rossi F. Nonmyogenic cells in skeletal muscle regeneration. *Current topics in developmental biology*. 2011;96:139-65. Epub 2011/05/31.
44. Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Human molecular genetics*. 2009;18(3):482-96. Epub 2008/11/11.
45. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279(5356):1528-30. Epub 1998/03/21.

46. Gussoni E, Bennett RR, Muskiewicz KR, Meyerrose T, Nolta JA, Gilgoff I, et al. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(6):807-14. Epub 2002/09/18.
47. Ferrari G, Stornaiuolo A, Mavilio F. Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature*. 2001;411(6841):1014-5. Epub 2001/06/29.
48. Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nature medicine*. 2003;9(12):1520-7. Epub 2003/11/20.
49. Montanaro F, Liadaki K, Volinski J, Flint A, Kunkel LM. Skeletal muscle engraftment potential of adult mouse skin side population cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(16):9336-41. Epub 2003/07/30.
50. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *The Journal of cell biology*. 2002;159(1):123-34. Epub 2002/10/16.
51. Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G, et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(2):182-95. Epub 2004/07/16.
52. Benchaouir R, Meregalli M, Farini A, D'Antona G, Belicchi M, Goyenvallé A, et al. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell stem cell*. 2007;1(6):646-57. Epub 2008/03/29.
53. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-40. Epub 1974/04/01.
54. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. Epub 2006/08/23.
55. Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, et al. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*. 2002;129(11):2773-83. Epub 2002/05/17.
56. Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *The Journal of cell biology*. 2004;164(3):441-9. Epub 2004/01/28.
57. Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA, et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 2003;301(5632):487-92. Epub 2003/07/12.
58. Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*. 2006;444(7119):574-9. Epub 2006/11/17.
59. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nature cell biology*. 2007;9(3):255-67. Epub 2007/02/13.

60. Dellavalle A, Maroli G, Covarello D, Azzoni E, Innocenzi A, Perani L, et al. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nature communications*. 2011;2:499. Epub 2011/10/13.
61. Cossu G, Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(12):520-6. Epub 2007/11/07.
62. Law PK, Bertorini TE, Goodwin TG, Chen M, Fang QW, Li HJ, et al. Dystrophin production induced by myoblast transfer therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*. 1990;336(8707):114-5. Epub 1990/07/14.
63. Torrente Y, Belicchi M, Marchesi C, Dantona G, Cogiamanian F, Pisati F, et al. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell transplantation*. 2007;16(6):563-77. Epub 2007/10/05.
64. Ho M, Post CM, Donahue LR, Lidov HG, Bronson RT, Goolsby H, et al. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Human molecular genetics*. 2004;13(18):1999-2010. Epub 2004/07/16.
65. Kobayashi K, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. The distribution and characterization of skeletal muscle lesions in dysferlin-deficient SJL and A/J mice. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2010;62(5):509-17. Epub 2009/07/21.
66. Lostal W, Bartoli M, Bourg N, Roudaut C, Bentaib A, Miyake K, et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Human molecular genetics*. 2010;19(10):1897-907. Epub 2010/02/16.
67. Leriche-Guerin K, Anderson LV, Wrogemann K, Roy B, Goulet M, Tremblay JP. Dysferlin expression after normal myoblast transplantation in SCID and in SJL mice. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2002;12(2):167-73. Epub 2001/12/12.
68. Kong KY, Ren J, Kraus M, Finklestein SP, Brown RH, Jr. Human umbilical cord blood cells differentiate into muscle in sjl muscular dystrophy mice. *Stem Cells*. 2004;22(6):981-93. Epub 2004/11/13.
69. Vieira NM, Bueno CR, Jr., Brandalise V, Moraes LV, Zucconi E, Secco M, et al. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells*. 2008;26(9):2391-8. Epub 2008/06/28.
70. Krahn M, Wein N, Bartoli M, Lostal W, Courrier S, Bourg-Alibert N, et al. A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Science translational medicine*. 2010;2(50):50ra69. Epub 2010/09/24.
71. Wein N, Avril A, Bartoli M, Beley C, Chaouch S, Laforet P, et al. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Human mutation*. 2010;31(2):136-42. Epub 2009/12/03.
72. Hattori H, Nagata E, Oya Y, Takahashi T, Aoki M, Ito D, et al. A novel compound heterozygous dysferlin mutation in Miyoshi myopathy siblings responding to dantrolene. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2007;14(11):1288-91. Epub 2007/09/18.
73. Lerario A, Cogiamanian F, Marchesi C, Belicchi M, Bresolin N, Porretti L, et al. Effects of rituximab in two patients with dysferlin-deficient muscular dystrophy. *BMC musculoskeletal disorders*. 2010;11:157. Epub 2010/07/14.



## Hypothesis

1. The expression of dysferlin in peripheral blood monocytes correlates with the expression in skeletal muscle and allows to differentiate patients with dysferlinopathy from patients with other muscle dystrophies, without the need to perform for a muscle biopsy.
2. Treatment with vitamin D3 increases the expression of dysferlin both in cell cultures and in human carriers of a single mutation in the DYSF gene.
3. Transplantation of murine MABs obtained from skeletal muscle biopsies of adult mice is effective as a therapy for a preclinical animal model of the disease.
4. Human pericytes participate in muscle regeneration and reparation *in vivo* in muscle dystrophies.





**Overall objective:**

Our objective was to deepen our knowledge of diagnostic and therapeutic strategies for patients with dysferlin deficient muscle dystrophy.

**Specific objectives:**

10. To study whether there is a correlation between dysferlin levels in skeletal muscle and in monocytes in patients with a dysferlin deficient muscular dystrophy.
11. To study the different patterns of dysferlin expression in the muscle biopsies of patients with a dysferlin deficient muscle dystrophy.
12. To determine whether the quantification of dysferlin expression in monocytes is useful to differentiate between carriers of a single mutation in the gene DYSF, patients with a dysferlin deficient muscle dystrophy or patients with other muscular dystrophies.
13. To study whether HL60 cells treated with vitamin D3 differentiate monocytes and express dysferlin. To know whether the levels of dysferlin expression are similar between HL60 treated cells and peripheral blood monocytes obtained from healthy volunteers.
14. To study whether treatment with vitamin D3 increases the expression of dysferlin in myoblasts/myotubes in vitro but also in vivo, in carriers of a single mutation in the gene DYSF.

15. To isolate mesoangioblasts (MABs) from skeletal muscle biopsies of adult mice. To characterize these studying their markers and their ability to differentiate to different mesenchyme tissues.
16. To study whether the transplantation of murine MABs is effective as a treatment of a murine model of dysferlinopathy.
17. To confirm that human MABs, a mesenchyme stem cell isolated from skeletal muscles, are in fact pericytes.
18. To study whether pericytes participate in the process of skeletal muscle regeneration in patients with muscle dystrophies.

## **General discussion of the results:**

The overall objective of this thesis was to expand our knowledge about the diagnostic process of dysferlinopathies and to explore new therapeutic options for this disease. The diagnosis process of muscular dystrophies requires a good clinical history and physical examination. There are many aspects that need to be answered by the patients, such as age of onset, the first muscles involved, the progression of the disease, and the existence of a familial history of muscle weakness, so as to identify a pattern of inheritance. Physical examination has to be performed accurately, identifying characteristic traits that distinguish between the various muscular dystrophies. Second, and with a suspected diagnosis in mind, several diagnostic tests can be performed, including whole-body muscle MRI, skeletal muscle biopsy and finally genetic studies. The diagnostic process before a candidate gene is selected for study can be long and expensive. Moreover, radiologic and pathological data often do not differentiate between muscle dystrophies, and reaching a final diagnosis can be very difficult. In the case of dysferlinopathies, the study of the expression of dysferlin in peripheral blood monocytes allows patients and carriers of the disease to be easily identified. As we demonstrate in this thesis, a positive correlation between the expression of dysferlin in skeletal muscle and that of monocytes rules out the need to take a muscle biopsy in many cases. We have also shown that the study of dysferlin in muscle biopsies using immunofluorescence can be misleading, since a reduction of dysferlin can be observed in many other dystrophies. Moreover, even in patients with a genetically confirmed dysferlinopathy, different patterns of expression can be found, ranging from absence of expression to a granular staining in the sarcoplasm of the muscle fibers. The study of dysferlin expression in skeletal muscle through WB is more useful, and should always

be performed as a complementary test to IF when the disease is suspected. But a muscle biopsy is not always available, or there may be just a very small quantity, or the sample may be in poor conditions. In these cases, the study of dysferlin expression in peripheral blood monocytes is again useful because if a marked reduction is found, the diagnosis of dysferlinopathy can be highly suspected and confirmed using genetic studies.

Moreover, monocytes are a source to obtain mRNA for the genetic studies too.

We have herein shown that monocytes are useful to identify carriers of a single mutation in the gene DYSF. We have established thresholds of expression that allow us to differentiate between patients with dysferlinopathy, carriers of a single mutation in the gene, and healthy volunteers with a high sensibility and specificity. We know that an expression lower than 17% is found only in patients, while expression levels between 17% and 80% can be found in carriers of a single mutation. Finally, levels of expression higher than 80% are found only in people with no mutations in the gene DYSF. The study of dysferlin expression in monocytes can be very useful also when genetic counselling is needed for the family of a patient with dysferlinopathy.

Moreover, we have showed that the study of dysferlin expression in monocytes can be useful as a complementary tool in clinical trials. We performed a clinical trial using vitamin D3 in carriers of a single mutation in the gene DYSF. We showed that one year of treatment significantly increased the expression of dysferlin in monocytes.

One of the problems of this technique is the need for a control sample with which to compare the result obtained in the subject under study. In daily practice we take samples from the partner of the patients or other people with no familial relationship with the patients. However, this is not always possible, requiring us to then look for other volunteers. For this reason, we have sought and found a cell model that can replace peripheral blood monocytes. In this thesis we have shown that treatment of HL60 cells

with vitamin D3 promotes their differentiation to mature monocytes, activating the expression of dysferlin to levels similar to those obtained from human controls, allowing their use as control sample for the study in patients. We have shown that vitamin D3 can increase the expression of dysferlin by these cells, even when different drugs block the differentiation to monocyte. Vitamin D3 has two ways to enhance dysferlin expression: a direct genomic way in which the activated vitamin D3 receptor of the membrane moves into the nucleus, joining the DYSF gene promoter and activating its expression, and an indirect way through the activation of the MAPK / ERK cascade. Treatment with vitamin D3 increases the expression of dysferlin in myoblasts and myotubes of patients with a single mutation in the gene DYSF. In addition, as mentioned above, it increases the expression of dysferlin *in vivo* in humans, as we have shown after performing a randomized clinical trial in which 17 subjects were treated for one year with vitamin D3. Based on these results, genetic therapies directed to correct one of the alleles of the gene DYSF (using for example exon-skipping or PTC124) could be complemented with vitamin D3 increasing the expression of dysferlin reaching near normal levels.

In this thesis we have also furthered studies into other possible therapies, such as cell therapy, considered one of the most promising treatments for muscular dystrophies. At present, mesoangioblasts are probably the most interesting stem cell for clinical trials. For this reason we decided to investigate whether these cells were useful in a murine model of dysferlinopathy. We isolated and characterized MABs from adult C57BL6 mice for the first time. These cells shared many characteristics with canine or human MABs, especially their ability to spontaneously differentiate into skeletal muscle *in vitro* and their ability to cross the vessel wall in response to inflammatory signals when they were injected into the bloodstream. We transplanted the cells into an immune

suppressed and dysferlin deficient murine model, the SCID BL/AJ model. One month after the injection, many muscular fibres expressed dysferlin, and we detected a significant increase in the expression of dysferlin in muscle using both Real Time PCR and WB. This new dysferlin was completely functional. We observed that muscle fibres recovered the ability to repair the membrane after a laser induced damage. These good results allow us to hypothesize that MABs may be a treatment for patients with a dysferlin deficient muscular dystrophy in the near future.

In view of the previous results observed with MABs we wondered whether these cells participate *in vivo* in the process of muscle regeneration in humans. Previously published studies suggested that pericytes might be the human counterpart of murine of canine MABs. We have shown that MABs isolated from skeletal muscles using sorting for alkaline phosphatase were in fact pericytes because they expressed many pericyte markers and they were located in a periendothelial position. AP positive cells sorted from skeletal muscle biopsies were able to differentiate to skeletal muscle when they were cultured over matrigel coated dishes. When cocultured with human myoblasts or myotubes they activated the myogenic program and fused producing mixed mature myotubes. We observed an increase in the number of AP positive pericytes in muscle biopsies of patients affected by muscle dystrophies. This increase correlated with an active degeneration/regeneration process, we observed the highest AP pericyte population in the biopsies with higher number of NCAM fibres, such as Duchenne muscle dystrophy. We detected AP positive pericytes expressing myogenic markers as MyoD in the vessel wall. We have also shown that AP positive muscle fibres are probably regenerative fibres because they also expressed many markers of regeneration such as developmental myosin or NG2. Moreover, *in vitro* studies showed that the expression of AP by the myotubes depended on the fusion of pericytes. All these results

allowed us to hypothesize that in a muscle dystrophy with a very active regeneration and degeneration process, different molecules secreted by the damaged muscle fibres or by the activated satellite cells promote the proliferation of pericytes and induce their differentiation to muscle participating in the regeneration of skeletal muscles.





## **CONCLUSIONS:**

**1. Quantification of dysferlin in peripheral blood monocytes is a useful test to diagnose muscle dystrophy produced by mutations in the gene DYSF and to differentiate it from other muscle dystrophies.** We base this on two main points: a) WB shows a positive correlation between the levels of dysferlin expression in peripheral blood monocytes and in skeletal muscle both in dysferlinopathy patients and in controls; b) WB study of dysferlin expression in peripheral blood monocytes differentiates patients with a dysferlinopathy (less than 20% expression) from carriers of a single mutation in the DYSF gene (expression between 20 and 80%) or people with no mutations in the gene DYSF (expression higher than 80%). This technique is particularly useful for family screening and for patient follow-up, avoiding the need for repeated biopsies.

**6. Vitamin D3 activates the expression of dysferlin both in vivo and in vitro and it can be used in the future as adjunctive treatment for gene or cell therapy.** We base this conclusion on three main points: a) vitamin D3 activates the expression of dysferlin in two ways, a direct genomic way mediated by the translocation of the receptor into the nucleus of the muscle fibres, and an indirect way through the activation of the MAPK/ERK cascade; b) HL60 cells treated with vitamin D differentiate to monocytes, and their expression of dysferlin is similar to that observed in monocytes from healthy volunteers (for this reason HL60 cells are a good candidate to serve as a control cell in studies of dysferlin expression in monocytes); and c) the treatment of carriers of a single mutation in the gene DYSF significantly increases the expression of dysferlin in peripheral blood monocytes.

**7. Mesoangioblasts isolated from skeletal muscle biopsies will be used for cell therapy of patients with dysferlinopathy.** We base this conclusion on two main points: a) mesoangioblasts isolated from adult mice share similar characteristics with other mesoangioblasts, specially their ability to differentiate to skeletal muscle both *in vivo* and *in vitro*; and b) the transplantation of mesoangioblasts in a murine model of dysferlinopathy restored dysferlin expression by muscle fibres and recovered the ability to repair the muscle membrane after a laser induced lesion.

**8. Pericytes participate in muscle regeneration in vivo. This conclusion is based** on three main points: a) human mesoangioblasts isolated from muscle biopsies are in fact pericytes; b) pericytes spontaneously activate the myogenic differentiation program *in vitro* and *in vivo* in muscle biopsies obtained from patients with different myopathies; and c) alkaline phosphatase positive muscle fibres found in myopathic biopsies are probably regenerative fibres generated from the fusion of pericytes with regenerating fibres.