





Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

**ESTUDIO PROSPECTIVO CLÍNICO Y RADIOLÓGICO DE  
LA ENFERMEDAD DE POMPE DEL ADULTO**

**AUTOR: SEBASTIÁN ARIEL FIGUEROA BONAPARTE**

**DIRECTOR: JORGE ALBERTO DIAZ MANERA**

**TUTOR ACADÉMICO: ISABEL ILLA SENDRA**

**TESIS DOCTORAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**

**BARCELONA, 2018**

A mis padres, mis hermanos, mis sobrinos y todos mis seres queridos, quienes me  
apoyaron en cada paso.

A Romina, la compañera de mi vida

A Violeta, el sentido de las cosas

## Agradecimientos

En primer lugar, quería darle las gracias a mi director de tesis, el Dr Jordi Díaz Manera. Infinitas gracias por permitirme incorporarme a tu proyecto, aconsejarme y compartir tus conocimientos, profesionalismo y amistad. Gracias por guiarme en esta tesis, que me ha permitido desarrollarme en todos los sentidos que una persona puede desarrollarse. Gracias. Esta tesis es tuya.

Quería agradecer a la Dra Isabel Illa, quien me permitió desarrollar este trabajo en la Unidad, apoyándome para cumplir mis objetivos y metas

Quiero expresar mis agradecimientos a Genzyme, quienes nos brindaron su aporte y apoyo para llevar adelante este proyecto, así como a Philips Healthcare Iberia, quienes siempre estuvieron cuando los necesitamos.

También quería agradecer a todos los miembros del Spanish Pompe Study Group, quienes colaboraron sin dudar en este proyecto: Miguel Angel Barba-Romero (Hospital General de Albacete, Albacete); Joseba Barcena (Hospital Universitario Cruces, Baracaldo); Pilar Carbonell (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla); María Rosario Carzorla (Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda); Carlota Creus (Hospital Virgen de las Nieves, Granada); Jaume Coll-Cantí (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona); Manuel Díaz (Hospital de Cabueñes, Gijón); Cristina Domínguez (Hospital 12 de Octubre, Madrid); Roberto Fernández Torrón (Hospital Universitario Donostia); María José García Antelo (Hospital Universitario A Coruña); Josep Maria Grau (Hospital Clínic, Barcelona); Adolfo López de Munáin (Hospital Universitario Donostia); Francisco Antonio Martínez-García (Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia); Yolanda Morgado (Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla); Antonio Moreno (Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia); Germán Morís (Hospital Universitario de Asturias, Oviedo); Miguel Angel Muñoz-Blanco (Hospital Gregorio Marañón, Madrid); Andres Nascimento (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona); José Luis Parajuá Pozo (Hospital de Can Mises, Ibiza); Arturo Robledo-Strauss (Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva); Íñigo Rojas-Marcos (Hospital Virgen de Macarena, Sevilla); Jose António Salazar (Hospital Regional Universitario de Málaga); Mercedes Usón (Hospital de Son Llàtzer, Palma de Mallorca)

Especial agradecimiento al Dr Antonio Escartin, quien me arropó cuando lo necesité. Nada hubiera podido hacer sin su ayuda. Muchas gracias, Toni.

A los pacientes y familiares, indudable motor de este proyecto.

**Muchas gracias a todos**

## Abreviaturas

EPA: enfermedad de Pompe del adulto

RNM: resonancia nuclear magnética

GAA: alfa glucosidasa ácida

CI: intervalo de confianza

ECA: enzima convertora de angiotensina

TRE: terapia de reemplazo enzimático

CVF: capacidad vital forzada

CK: creatinquinasa

ALT: alanina aminotransferasa

AST: aspartato aminotransferasa

LDH: lactato dehidrogenasa

EMG: electromiografía

PIM: presión inspiratoria máxima

PEM: presión espiratoria máxima

CRIM: cross reactive immune material

6-MWT: six minute walking test

MRC: medical research council

STIR: short-tau inversión recovery

WBMRI: whole body magnetic resonance imaging

Pdff: proton density fat fraction

LGMD: distrofia muscular de cinturas

OPMD: distrofia oculofaríngea

TAC: tomografía axial computada

FKRP: fukutin-related protein

ROI: región of interest

FF: fat fraction

NS: no significativo

MU: multifidus

LO: longissimus

IL: iliocostalis

QU: quadratus femoris

PS: psoas

ABD: musculatura abdominal lateral

RA: rectus abdominis.

RF: rectus femoris

VL: vastus lateralis

VM: vastus medialis

VI: vastus intermedius

AM: adductor major

AL: adductor longus

BSH: bíceps cabeza corta

BLH: bíceps cabeza larga

ST: semitendinosus

SM: semimembranosus

SA: sartorius

GR: gracillis.

## **Resumen**

La terapia de reemplazo enzimático (TRE) ha demostrado ser efectiva para la enfermedad de Pompe del adulto (EPA). El descubrimiento de biomarcadores útiles para la monitorización de la progresión de la enfermedad es uno de los tópicos de investigación prioritarios en esta enfermedad. La RNM muscular puede ser una opción, pero la correlación entre RNM muscular, fuerza y función ha sido solo parcialmente estudiada. Se necesitan biomarcadores creíbles para el seguimiento de pacientes bajo TRE y pacientes asintomáticos en la práctica clínica. El impacto de la TRE en las capacidades motoras después de largos períodos de tratamiento también es un área de discusión.

Estudiamos 34 pacientes con EPA utilizando escalas funcionales, tests respiratorios, escalas de actividades de la vida diaria y de calidad de vida. Efectuamos una RNM muscular corporal total (del inglés WBMRI) usando secuencias T1w y 3-point Dixon centrados en muslo y tronco. Los pacientes fueron reevaluados después de un año. Además, estudiamos las características clínicas de una cohorte de 32 pacientes con EPA bajo TRE. Recolectamos datos sobre el inicio de los síntomas, inicio del tratamiento, progresión clínica y situación funcional antes del inicio de la TRE y en la actualidad.

La RNM muscular corporal total en secuencia T1w demostró un patrón homogéneo de compromiso muscular, que también fue evidenciado en pacientes presintomáticos. Encontramos una correlación significativa entre fuerza muscular, escalas de función muscular, y el grado de reemplazo muscular graso mediante RNM muscular usando secuencias T1w y 3-point Dixon. Inclusive, la RNM muscular detectó infiltrados grasos leves en musculatura paraespinal en pacientes presintomáticos. Se demostró un incremento significativo del infiltrado graso del 1.7% en musculatura de muslos en pacientes sintomáticos con EPA. No hubo diferencias significativas en los test de función muscular en el mismo período de tiempo. No observamos cambios tanto en la RNM muscular como en los test de función muscular en los pacientes asintomáticos en un período de un año. También analizamos 18 pacientes tratados con TRE por menos de 5 años, así como 14 pacientes tratados por más de 5 años. Observamos que los pacientes tratados menos de 5 años mantenían plenamente sus capacidades motoras, pero se evidenciaba un declive de las mismas en pacientes tratados más de 5 años, en actividades como subir escaleras o caminar sin ayudas.

Basados en nuestros hallazgos, consideramos que la RNM muscular se correlaciona con la función muscular en pacientes con EPA y podría ser utilizado para el diagnóstico

y seguimiento de pacientes presintomáticos y sintomáticos bajo tratamiento. La RNM muscular en secuencia 3-point Dixon es una potente herramienta para detectar cambios en la estructura muscular en pacientes sintomáticos y podría ser considerada como parte del protocolo de seguimiento en la práctica clínica y en ensayos terapéuticos. A pesar que la TRE probablemente haya cambiado la historia natural de la enfermedad enlenteciendo su progresión, se aprecia un aumento de las dificultades para efectuar tareas motoras en pacientes tratados más de 5 años.

### **Summary**

Enzyme replacement therapy has shown to be effective for late onset Pompe disease (LOPD). The discovery of biomarkers useful for monitoring disease progression is one of the priority research topics in Pompe disease. Muscle MRI could be one possible test but the correlation between muscle MRI and muscle strength and function has been only partially addressed so far. Reliable biomarkers are needed to follow-up ERT treated and asymptomatic LOPD patients in clinical practice. The impact of the treatment in motor activities after a long period of time is still unknown.

We studied 34 LOPD patients using functional scales, respiratory tests, daily live activities scales and quality of life scales. We performed a whole body muscle MRI using T1w and 3-point Dixon imaging centered on thighs and lower trunk region, and reevaluated patients one year later. We have studied the clinical features of a cohort of thirty-two LOPD patients receiving ERT. We collected information about onset of symptoms, onset of treatment, clinical progression and functional situation before ERT and at present.

T1w whole body muscle MRI showed a homogeneous pattern of muscle involvement that could also be found in pre-symptomatic individuals. We found a strong correlation between muscle strength, muscle functional scales and the degree of muscle fatty replacement in muscle MRI analyzed using T1w and 3-point Dixon imaging studies. Moreover, muscle MRI detected mild degree of fatty replacement in paraspinal muscles in pre-symptomatic patients. Muscle MRI showed a significant increase of 1.7% on fat content on thigh muscles in symptomatic LOPD patients. In contrast, there were not significant differences in muscle function test in the same period of time. We did not observe any significant change both in muscle MRI or in muscle function tests in asymptomatic patients in one year period of time. We also analyzed eighteen patients that were treated for less than five years while 14 patients received the treatment for more than 5 years. We observed that patients treated less than 5 years fully maintained their motor skills, but we could appreciate a decline in patients' ability to perform specific

tasks, such as climbing stairs or walking without assistance in patients treated more than 5 years.

Based on our findings, we consider that muscle MRI correlates with muscle function in patients with LOPD and could be useful for diagnosis and follow-up in pre-symptomatic and symptomatic patients under treatment. 3-point Dixon muscle MRI is an useful tool to detect changes in muscle structure in symptomatic LOPD patients and it could be considered as part of the current follow-up protocol and in clinical trials. Eventhough ERT has probably changed the natural history of the disease slowing down the disease's progression, we observed an increase in severity of motor disability in patients treated for more than 5 years.



## INDICE

1. Introducción	10
1.1 Acerca de la enfermedad de Pompe del adulto	11
1.1.1 Epidemiología	12
1.1.2 Genética	13
1.1.3 Fisiopatología	15
1.1.4 Aspectos clínicos de la EPA	18
1.1.5 Diagnóstico	20
1.1.5.1 Hallazgos analíticos	20
1.1.5.2 Hallazgos en el EMG	20
1.1.5.3 Hallazgos en espirometría	21
1.1.5.4 Hallazgos en biopsia muscular	21
1.1.5.5 Hallazgos en RNM muscular	22
1.1.5.6 Gota seca	22
1.1.5.7 Estudio genético	22
1.1.6 Tratamiento	23
1.2 Acerca de la RNM muscular en enfermedades musculares	27
1.2.1 RNM muscular cualitativa	27
1.2.2 RNM muscular cuantitativa	31
1.3 Acerca de la RNM muscular en EPA	34
2. Hipótesis y objetivos	38
3. Materiales y métodos	40
3.1 Aspecto metodológico	41
3.2 Pacientes	41
3.3 Valoración clínica	42
3.4 Genética	42
3.5 Valoración función muscular	42
3.6 RNM muscular	43
3.7 Heatmaps	45
3.8 Estadística	46
4. Resultados	47
4.1 Características clínicas y genéticas de la cohorte	48
4.2 Evaluación retrospectiva de respuesta al tratamiento	52
4.3 Análisis transversal de RNM muscular en T1W: descripción de patrón de compromiso muscular	57
4.4 Análisis transversal de RNM muscular en 3-point Dixon	59

4.5 Correlación de RNM muscular cualitativa, cuantitativa y pruebas de función motora	62
4.5.1 Análisis de función muscular	62
4.5.2 Correlación entre tests de función muscular y RNM muscular	64
4.6 Cambios en pruebas funcionales y RNM muscular en un año de seguimiento	69
5. Discusión	75
5.1 Utilidad de la RNM cuantitativa para el seguimiento de pacientes con enfermedad de Pompe del adulto	79
5.2 Características clínicas y genéticas de la cohorte	82
5.3 Descripción de los hallazgos de RNM muscular mediante secuencias T1W y 3-point Dixon en nuestra cohorte	82
5.4 Correlación de la función muscular con RNM muscular cuali- y cuantitativa en EPA	83
5.5 Evolución clínica de paciente bajo terapia de reemplazo enzimático por períodos mayores a 5 años	85
7 Conclusiones	87
8 Lineas de futuro	89
9 Bibliografía	91
10 Anexos	109

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

La introducción de esta tesis doctoral se dividirá en tres secciones: acerca de la enfermedad de Pompe del adulto (EPA), acerca de la resonancia nuclear magnética (RNM) en enfermedades musculares, y acerca de la RNM muscular en EPA.

### 1.1 Acerca de la enfermedad de Pompe del adulto

La enfermedad de Pompe (déficit de maltasa ácida, glucogenosis tipo II, OMIM ID: 232300 ) es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva, multisistémica, producida por mutaciones del gen GAA, lo cual lleva a un déficit de la enzima alfa-glucosidasa(1), con compromiso de músculo estriado, cardíaco y liso (2). Esta enzima se encarga de degradar el glucógeno en los lisosomas. El glucógeno se acumula en prácticamente todos los tejidos del organismo, con particular preferencia por el tejido muscular.

Existe un espectro clínico continuo en enfermedad de Pompe, que abarca desde fenotipos muy graves, rápidamente progresivos, hasta formas menos severas y más lentas en su evolución. La nomenclatura actual abarca distintos subtipos (3):

-Enfermedad de Pompe infantil clásica, cuyos síntomas empiezan antes del año de edad, se asocia a miocardiopatía hipertrófica, y se relaciona con ausencia prácticamente total de actividad de alfa-glucosidasa. Los neonatos desarrollan una debilidad generalizada y grave apenas nacen, con hipotonía, disfagia, macroglosia, hepatomegalia, miocardiopatía hipertrófica e insuficiencia respiratoria. No llegan a alcanzar hitos de desarrollo básicos, como caminar, y suelen morir dentro del primer año de vida a consecuencia de complicaciones de la miocardiopatía hipertrófica o de la insuficiencia respiratoria. (4,5)

-Enfermedad de Pompe infantil no clásica (conocido también como formas intermedias) que abarca pacientes cuyos síntomas se hayan iniciado desde el nacimiento a la adolescencia. Los síntomas predominantes son en forma de afectación muscular esquelética, que pueden producir contracturas articulares o escoliosis. Pueden desarrollar debilidad de la musculatura respiratoria pero no acostumbran a tener afectación cardíaca.

-Enfermedad de Pompe del adulto (EPA), cuyos síntomas se inician desde la adolescencia a edad adulta. Los pacientes habitualmente presentan un patrón de debilidad muscular axial y de cinturas, así como fallo respiratorio (6). Sin embargo, este fenotipo ha ido ampliándose progresivamente (7). La mayoría de los pacientes finalizan

requiriendo silla de ruedas y ventilación no invasiva (8)(9). Suele persistir actividad residual de la enzima GAA.



Fig. 1. El espectro de la enfermedad de Pompe. *Modificado de Gungör and Reuser (3)*

En esta tesis doctoral, nos focalizaremos en la EPA.

### 1.1.1 Epidemiología

Existen pocos estudios epidemiológicos en enfermedad de Pompe. La incidencia estimada varía acorde el tipo clínico y las diferencias étnicas: oscila entre 1:14000 en población afro-americana a 1:100000 en individuos de ascendencia europea(10). La frecuencia en la población holandesa, por citar una población bien estudiada, es de alrededor de 1:57000 (11).

Tabla 1. Epidemiología de enfermedad de Pompe

		95% CI
Pompe infantil	1/138000	1/43169 – 1/536485
Pompe del adulto	1/57000	1/27734 – 1/128255
Pompe infantil + adulto	1/40000	1/17622 – 1/100073

Frecuencia predicha de enfermedad de Pompe en población holandesa. *Modificado de Ausems et al (11)*

Estudios efectuados en la ciudad de Nueva York, evidenciaron una incidencia estimada de 1:40000, tanto de las formas tanto infantiles como de adultos (12), mientras que el estado de portador se estimó en 1/100. En otros nichos poblacionales, como en la taiwanesa, la incidencia fue de aproximadamente 1:32000 (13). Por consiguiente, para una población como la española, se podrían esperar alrededor de 1000 pacientes (formas infantil + adulta), y alrededor de 700 pacientes sólo con EPA.

Un segundo grupo de estudios epidemiológicos se ha centrado en investigar población de riesgo (hiperckemia, debilidad de cinturas). Estos estudios demuestran que la

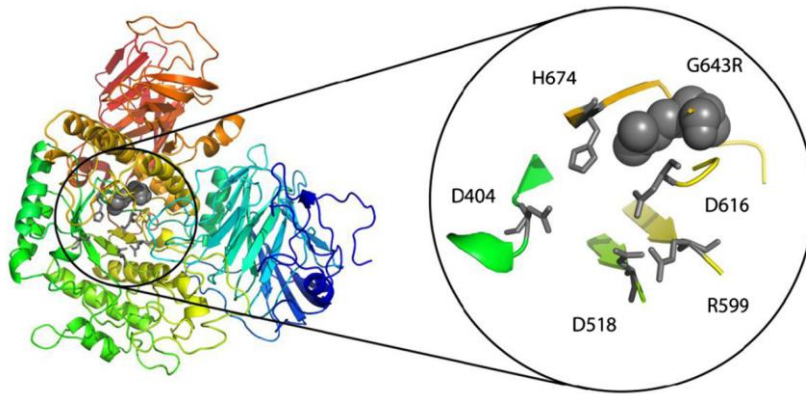
prevalencia aproximada de la EPA en pacientes con debilidad proximal de cinturas no clasificadas y/o en hiperCKemia, oscila en alrededor del 2,5% al combinar los datos de distintos estudios (14,15) (16)(17)(18)(19) Esta prevalencia tiene variación poblacional: mientras sería particularmente alta en población afro-americana, holandesa o taiwanesa, sería particularmente baja en otros registros, como en el finlandés (17). Lukacs et al demostraron en un estudio prospectivo de 3076 pacientes en Alemania y Reino Unido, 74 nuevos pacientes con diagnóstico de EPA, lo que se corresponde con una prevalencia del 2,4% (14). En España, Gutierrez-Rivas et al (15) confirmaron la presencia de 20 casos de EPA sobre 348 sospechosos, lo que da una incidencia del 5,7% en poblaciones de riesgo.

El estudio DIPPER (20), efectuado en población portuguesa , demostró una prevalencia del 16.8% de EPA en pacientes con parálisis diafragmática de etiología no determinada (3 de 18 pacientes). Por lo tanto, también sería recomendable efectuar screening con gota seca en estos pacientes.

#### 1.1.2 Genética

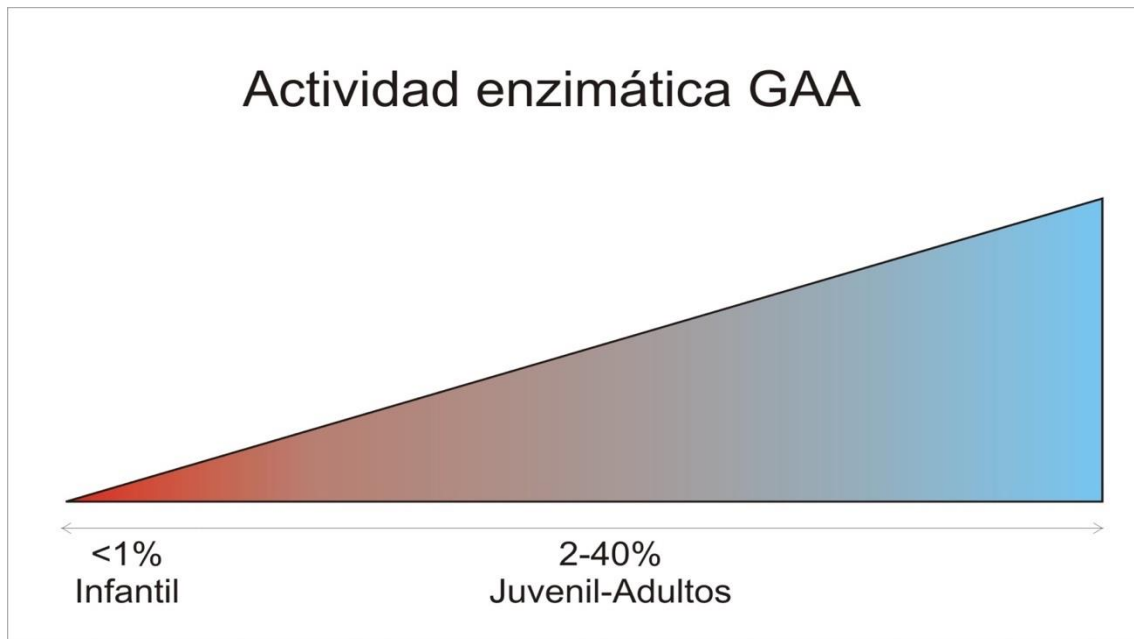
Varias mutaciones han sido detectadas en el gen GAA que pueden producir la enfermedad. Las más frecuentes son mutaciones “missense” (en castellano, mutación con cambio de sentido), deleciones, o “splicing” (en castellano, mutación en el empalme de genes) (21). En ese sentido, la mayor cantidad de información genética disponible en la actualidad está incluida en el Genzyme Pompe Registry ([www.pompecenter.nl](http://www.pompecenter.nl)). Se han analizado las mutaciones de 898 pacientes incluidos en dicho registro (22) , de los cuales se han descrito 1724 variantes. De la suma de formas infantiles y del adulto, un 38,7% se originaban en “splicing”, y un 31,8% eran mutaciones “missense”. En EPA, la variante más frecuente es “splicing”, en un 44,6% de los casos. Un 3,8% de los pacientes con EPA eran homocigotos para 2 variantes, versus un 33% en las formas infantiles. De todas ellas, la inversión IVS1-13T-G es la más frecuente en EPA (23), siendo la mayoría de los pacientes heterocigotos para esta mutación.

El fenotipo clínico de la mutación IVS1-13TG varía ampliamente, aunque hay que destacar que un 73% de los casos tienen un compromiso clínico leve. Esta heterogeneidad clínica, aún dentro de la misma mutación, dificultan la posibilidad de inferir una correlación genotipo – fenotipo en EPA. A diferencia de las formas infantiles, directamente relacionada con la ausencia de GAA, la existencia de otros genes o factores probablemente guarden una mayor influencia en la clínica(23) .



**Figura 2 . Estructura de GAA. Mutación G643R. Modificado de De Filipi(24)**

Es bien conocido que el nivel de actividad enzimática se correlaciona con la severidad de la enfermedad acorde la edad. De esta forma, los pacientes con la forma infantil suelen tener < 1% de actividad enzimática; la forma juvenil, entre 2 y 6 % de actividad; la EPA no muestra una clara correlación con el nivel de actividad residual, ya que puede variar entre el 1 al 29%. En conclusión, mientras la relación genotipo – actividad enzimática es más clara en las formas de inicio infantil, en las que la existencia de mutaciones non-sense se traduce en una ausencia de actividad de GAA, no es tan evidente en las formas de inicio en la edad adulta, en las que prevalecen mutaciones missense, con actividad enzimática residual(23)(24,25)



**Fig. 3. Correlación entre actividad enzimática y fenotipo clínico. Gentileza de Jordi Díaz-Manera**

Se sabe que existen moduladores de la enfermedad, como por ejemplo el genotipo DD de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), el cual se relaciona con inicios más precoces de la enfermedad, o con el polimorfismo R577X del gen ACTN3 (24). La presencia de dolor muscular se ha asociado al genotipo mencionado de la ECA.

### 1.1.3 Fisiopatología

La EPA se caracteriza por una pérdida parcial de la actividad de la enzima GAA, la cual es indispensable para la hidrólisis del glucógeno dentro de los lisosomas. Hay una acumulación de glucógeno en el interior de los lisosomas de las fibras musculares. A medida que progresa la enfermedad, el número de lisosomas repletos de glucógeno se incrementa, ocupando progresivamente todo el sarcoplasma impidiendo un correcto funcionamiento del aparato contráctil muscular, lo que se traduce en debilidad muscular.

En el metabolismo normal, la glucosa es convertida a glucógeno como una forma de almacenamiento de energía en el citoplasma. Cuando hay necesidades energéticas, este glucógeno es incorporado a los lisosomas y convertido en glucosa, mediante la acción de la enzima GAA. El proceso de internalización del glucógeno capturado en una membrana al lisosoma se da por un mecanismo denominado autofagia. A continuación, la glucosa liberada es sometida al proceso de glucólisis en el citoplasma celular. Si bien la EPA es traducible como un fallo en un proceso metabólico, no genera intolerancia al ejercicio, sino debilidad fija, a diferencia de la mayoría de las glucogenosis (26).

En la teoría clásica de la fisiopatogenia de la enfermedad, se describen los siguientes estadios(27):

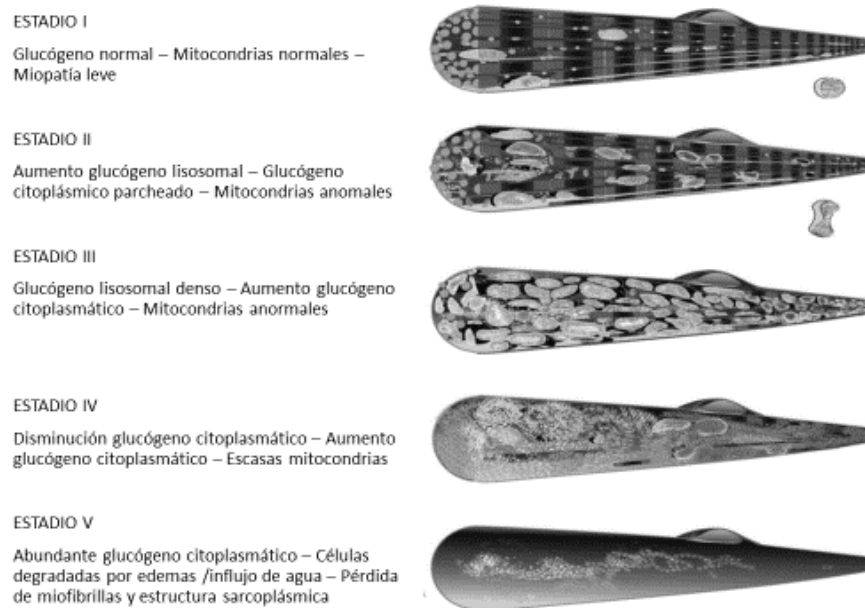
Estadio I: Acumulación de pequeños lisosomas cargados de glucógeno, en íntimo contacto con las miofibrillas.

Estadio II: Aumento de la carga citoplasmática de glucógeno, asociado a un aumento y tamaño de los lisosomas. La acción de enzimas autolíticas liberadas desde los lisosomas tras la destrucción secundaria a la acumulación intralisosomal, lleva a la acumulación de glucógeno entre las miofibrillas produciendo daño miofibrilar (28).

Estadio III: Acúmulo de los lisosomas cargados de glucógeno (vacuolización), algunos con evidencia de rotura de membranas, y gran destrucción miofibrilar

Estadio IV y V: La mayoría del glucógeno ya es citoplasmático, están dañadas las unidades de contracción de la fibra muscular, y se produce influjo de agua desde el exterior. A posteriori, reemplazo graso





**Figura 4. Esquema de estadios ultraestructurales de la progresión de enfermedad de Pompe. Modificado de Thurberg(27)**

En esta enfermedad, se objetivan tanto un trastorno de la vía endocítica como en la vía de autofagia, lo que conduce a una acumulación excesiva de vesículas autofagocíticas en fibras musculares resistentes a terapia de reemplazo enzimático (ratones knock out-GAA) (29)

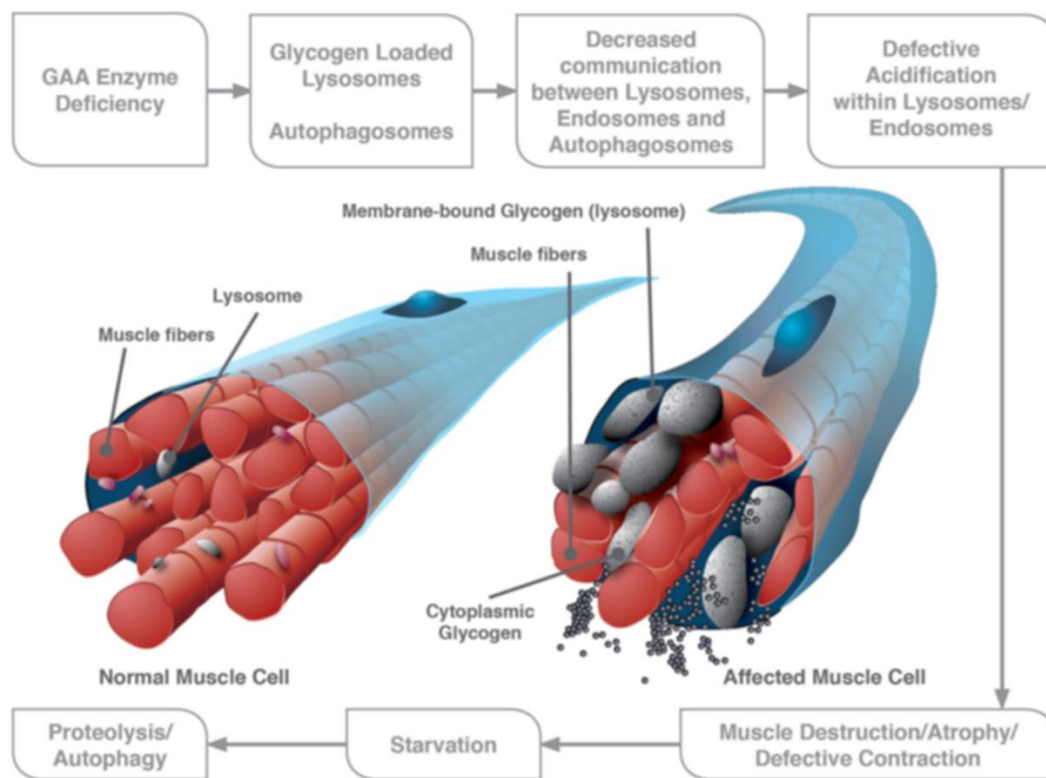
Esta descripción genera la sensación que la expansión lisosomal y la destrucción de los mismos es el mecanismo fisiopatológico preponderante en EPA. Sin embargo, los resultados en pacientes adultos y en modelos de ratón, sugieren un rol preponderante de la autofagia en la patogénesis de la enfermedad (30)

Tanto en EPA como en otras enfermedades musculares, las fallas en el proceso de autofagia tienen un rol determinante (31). La autofagia juega un rol fundamental en la homeostasis muscular, proveyendo de un sistema finamente regulado que media entre la degradación proteica en los lisosomas y la remoción de organelas (32). Los lisosomas juegan un rol crucial en esta vía, que involucra el secuestro de una porción del citoplasma en autofagosomas con doble membrana y la fusión de los mismos con los lisosomas para el reciclaje del material incorporado (33). En este proceso, participan más de 30 proteínas diferentes, entre las que destaca LC3 como marcador de autofagosoma, y el LAMP1 como marcador de lisosomas (34).

La autofagia es un mecanismo de supervivencia bajo privación de nutrientes. Bajo condiciones normales, los fagosomas y anisomas son rápidamente degradados por los lisosomas y su contenido es reciclado. Por el contrario en fibras musculares tipo II de

ratones knock out-GAA se observa una acumulación significativa de autofagosomas(35). El proceso de autofagia optimiza la sobrevivencia miofibrilar en EPA facilitando la maduración de GAA, mientras que su deterioro favorece el proceso de debilidad muscular y atrofia (36). Cuando la GAA no actúa eficientemente, el glucógeno lisosomal no se degrada y se acumula.

La correlación entre fallas en la autofagia y atrofia muscular es particularmente evidente en EPA(37). En estos pacientes, un flujo autofágico relativamente preservado, independientemente de la actividad enzimática, se asocia a menos cambios en la histopatología y a un fenotipo más leve. El análisis de biopsias musculares tomadas en distintos estadios confirma esta correlación. De hecho, la inhibición del proceso de autofagia en modelos de músculo adulto sano resulta en atrofia y debilidad(38,39). La terapia de reemplazo enzimático (TRE) ha demostrado generar una mejora del proceso de autofagia(40). Se requiere un correcto sistema de tráfico celular para la llegada de la droga al lisosoma, para permitir un mejor procesamiento y maduración de GAA.



**Fig 5. Patofisiología de la EPA. Modificado de Al Jasmi (41)**

También existe evidencia de alteraciones mitocondriales como participantes en la fisiopatología de la enfermedad. Bajo el término miopatías vacuolares autofágicas (42) encontramos tanto la enfermedad de Danon como enfermedad de Pompe, exhibiendo ambas signos de disfunción mitocondrial, lo que incluye cambios morfológicos,

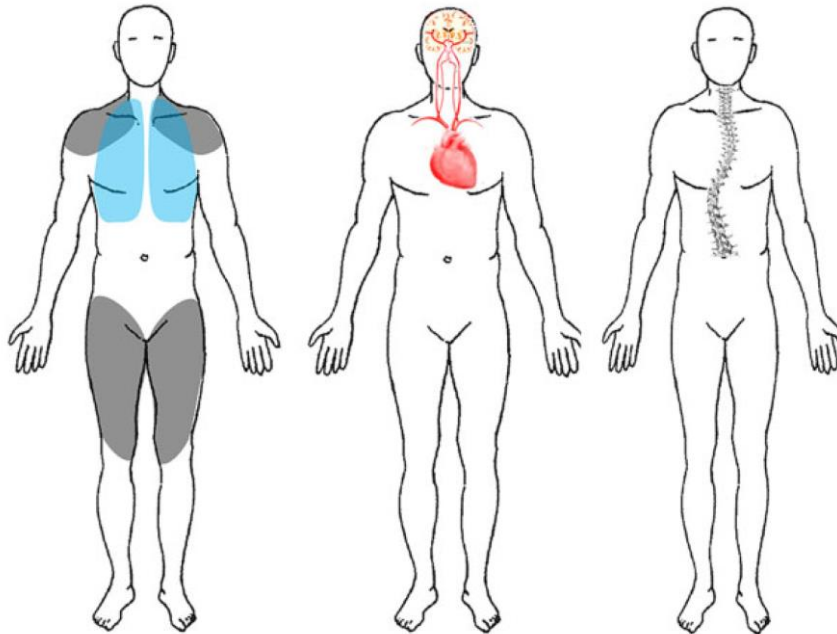
disminución del potencial de membrana mitocondrial, disminución de la producción de ATP, aumento del stress oxidativo, y apoptosis(43). Esta disfunción mitocondrial termina generando fallas en la ubiquitinización de las proteínas de la membrana mitocondrial externa, con la consiguiente alteración de la autofagia(44). Un número significativo de mitocondrias dañadas permanece en el citosol y no son incorporados a los lisosomas, probablemente como consecuencia de esta falla en el flujo autofágico(45).

#### 1.1.4 Aspectos clínicos de la EPA

La EPA es una enfermedad multisistémica que típicamente se manifiesta con debilidad muscular axial y de cinturas, así como una insuficiencia respiratoria progresiva debido a falla de musculatura intercostal y diafragmática (46) (7). En la actualidad, el fenotipo de la enfermedad se ha ampliado, abarcando tanto compromiso muscular, como cerebrovascular y óseo.

Fenotipos posibles(7)

1. Hiperckemia. (15,16)
2. Debilidad muscular: axial y de cintura pélvica. Alteración de la marcha y de la postura. (47)
3. Afectación respiratoria(48)
4. Afectación extramuscular:
  - a. Vasos: aneurismas(49)
  - b. Sistema nervioso:
    - neuropatía de fibra fina(50)
    - leucoencefalopatía(51)
  - c. Corazón
    - hipertrofia cardíaca(52,53)
    - arritmias(54)
    - anomalías aórticas(55)
  - d. Óseo:
    - osteoporosis(56)
    - síndrome de espina rígida (57)
  - e. Compromiso bulbar: disartria y disfagia(58,59)
  - f. Síntomas gastrointestinales(60)(diarrea crónica, vómitos posprandiales y dolor abdominal)



**Figura 6. Manifestaciones clínicas por subtipo de EPA. Izquierda: Manifestación de compromiso de cinturas y diafragmático. Medio: Patrón cardio-cerebrovascular. Derecha: Síndrome de espina rígida y escoliosis. En todos los patrones puede haber debilidad muscular. Modificado de Schuller (57)**

Los pacientes suelen presentar una disminución de fuerza proximal en extremidades, alteraciones posturales durante la marcha, y un signo de Gowers positivo asociado a la utilización de manos y brazos para levantarse de la posición sentada, ante la debilidad de caderas y muslos(8,47). Los síntomas iniciales abarcan compromiso de musculatura de cintura pélvica, síntomas respiratorios, y debilidad de musculatura de tronco (paraespinal y abdominales). El 80% de los pacientes con EPA tienen afectación de estos tres compartimentos (57). Si bien la evolución de los síntomas apoya el diagnóstico de EPA, los síntomas iniciales son superponibles a muchas otras enfermedades neuromusculares.

La debilidad en extremidades inferiores se asocia a un compromiso más proximal que distal, con preeminencia en extremidades inferiores respecto a superiores. Con la progresión de la enfermedad, los pacientes presentan dificultad para diversas actividades motoras, como subir escaleras, hacer deportes, o correr.

La debilidad predomina en extensores de cadera (musculatura glútea), aductores y abductores, seguido del músculo psoas. A posteriori, los músculos posteriores del muslo se afectan selectivamente. La musculatura tanto de piernas como pies se suele mantener indemne(61)

Tanto la debilidad de la musculatura paravertebral como la abdominal, se traducen en atrofia y degeneración grasa(61). Hay una marcha muy característica de los pacientes con EPA, correspondiente a una marcha “bamboleante”, asociada a hiperlordosis lumbar(62) , así como es frecuente la presencia de signo de Beevor (63)

El compromiso diafragmático, y por ende respiratorio, suele terminar llevando a insuficiencia respiratoria y a hipoventilación nocturna. Los síntomas respiratorios habituales suelen ser somnolencia diurna, fatiga, cefalea, y mala calidad de sueño (64) (65). El compromiso respiratorio puede preceder la afectación de extremidades.

La debilidad muscular respiratoria llega a afectar al 80% de los pacientes(8). Compromete tanto la función inspiratoria como espiratoria, acorde tests funcionales pulmonares(65). Una caída >10% de la capacidad vital forzada (CVF) al pasar de la posición sentado a acostado se ha relacionado con debilidad diafragmática(66) . A pesar de la utilización de soporte ventilatorio mecánico, sigue siendo la falla respiratoria la principal causa de muerte(47). En la progresión de la enfermedad, es muy frecuente el desarrollo de ortopnea.

En lo que respecta al compromiso vascular, es reconocida la existencia de aneurismas intracraneales en EPA. Esto es consecuencia de la degeneración vacuolar y pérdida de la integridad de las paredes vasculares secundariamente al depósito de glucógeno(67). La vasculopatía se puede presentar como dolicoectasia basilar, aneurisma y microhemorragias(49). Se estima que la prevalencia de aneurismas en pacientes con EPA rondaría el 2,7%(68).

### 1.1.5 Diagnóstico

#### 1.1.5.1 Hallazgos analíticos

El valor de CK suele estar elevado hasta en un 95% de los pacientes(69), variando el rango entre valores normales hasta 15 veces la normalidad. El valor de CK puede ser elevado aún en pacientes pre-sintomáticos. También suele elevarse el valor de ALT, AST y LDH. Alrededor de un 10% de los pacientes pueden presentar CK normales, con elevación de ALT /AST.

#### 1.1.5.2 Hallazgos en EMG

Aproximadamente un 70% de los pacientes pueden presentar un patrón miopático en el EMG(47), si bien el mismo también puede ser normal. Estudiar músculos proximales puede permitir detectar anormalidades con más frecuencia. Se pueden hallar descargas miotónicas, así como signos de denervación aguda, especialmente en musculatura débil, como por ejemplo podría ser a musculatura axial

#### 1.1.5.3 Hallazgos en espirometría

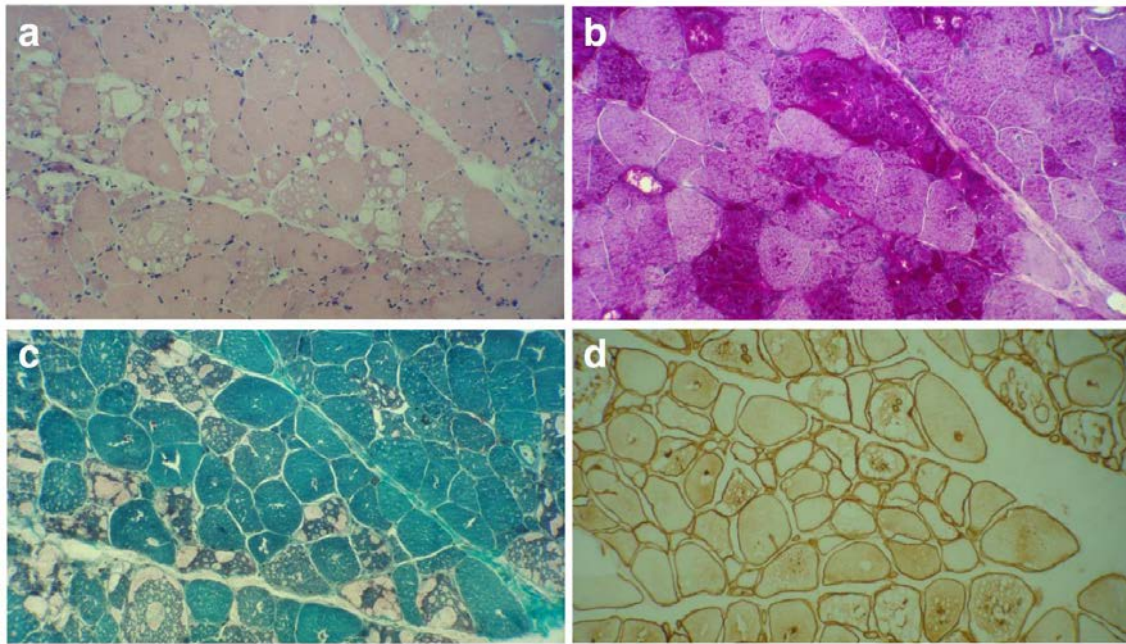
Alrededor de un 60% de los pacientes tienen una reducción leve de la CVF (<80 % predicho) mientras que un 30 – 40% tienen una reducción moderada (<60 % predicho)

La medición de la CVF debe efectuarse con el paciente sentado y acostado. La misma suele descender un 10% al pasar de la posición sentado a acostado cuando hay debilidad diafragmática, y puede aumentar hasta un 30% si la debilidad es severa(70).

Si se objetiva esta debilidad, deben efectuarse tests pulmonares complementarios, así como una pulsioximetría nocturna para buscar apnea nocturna, siempre que los pacientes se quejen de somnolencia diurna, fatiga inexplicada, o cuando la CVF cae por debajo del 40-50% de lo predicho. Dentro de los test pulmonares se deben incluir medición de la presión inspiratoria máxima (PIM) y presión espiratoria máxima (PEM), ya que son más sensibles para medir debilidad muscular respiratoria precoz (2)

#### 1.1.5.4 Hallazgos en biopsia muscular

La biopsia muscular puede ser usada como método diagnóstico o confirmatorio en EPA. Habitualmente destaca la presencia de vacuolas PAS-positivas, asociadas a la acumulación de glucógeno en lisosomas y citosol. Dentro de las limitaciones, destaca la existencia de falsos negativos, lo invasivo del procedimiento, y la necesidad de personal entrenado. En algunos casos, se pueden encontrar resultados inespecíficos. Entre un 20-30% de los pacientes con EPA con disminución documentada de la GAA, tienen una biopsia muscular normal.



**Fig. 7. Biopsia muscular en paciente con EPA. A) Hematoxilina – eosina. B) Tinción de PAS. C) Tricrómico de Gomori. D) Tinción para distrofina. Modificado de Al Jasmi (41)**

#### 1.1.5.5 Hallazgos en RNM muscular

La RNM muscular podría brindar información sobre el tipo de compromiso muscular y la severidad del mismo, así como facilitar la determinación del sitio de la biopsia(71), pero no es indicación en el screening inicial necesariamente.

La utilidad de la RNM muscular en EPA se desarrollará más adelante.

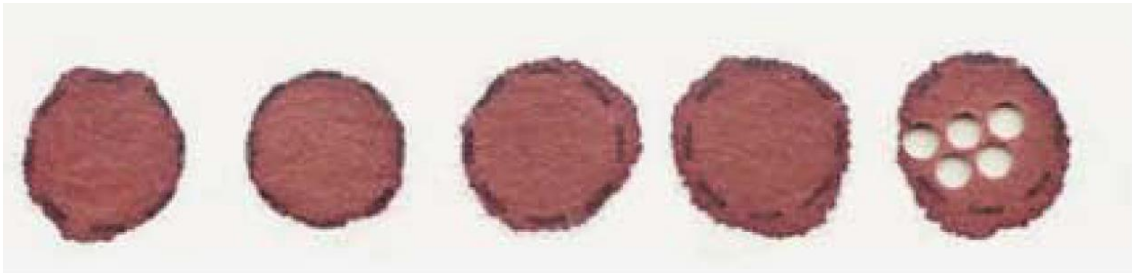
#### 1.1.5.6 Gota seca

La gota seca es el test de screening ideal en EPA (72), en razón de su simplicidad y bajo precio. La técnica consiste en obtener una gota de sangre del paciente, la cual se impregna en un papel, y se mide la actividad de GAA usando espectro-fluorometría con GAA recombinante para inmunocuantificación(73). Un test de gota seca positivo debe ser confirmado con un segundo test analizando la actividad enzimática en linfocitos de sangre periférica. Si este resultado es también patológico se recomienda análisis genético. Es importante recordar que la actividad enzimática se puede analizar en otros tejidos como músculo esquelético o fibroblastos de piel.

#### 1.1.5.7 Estudio genético

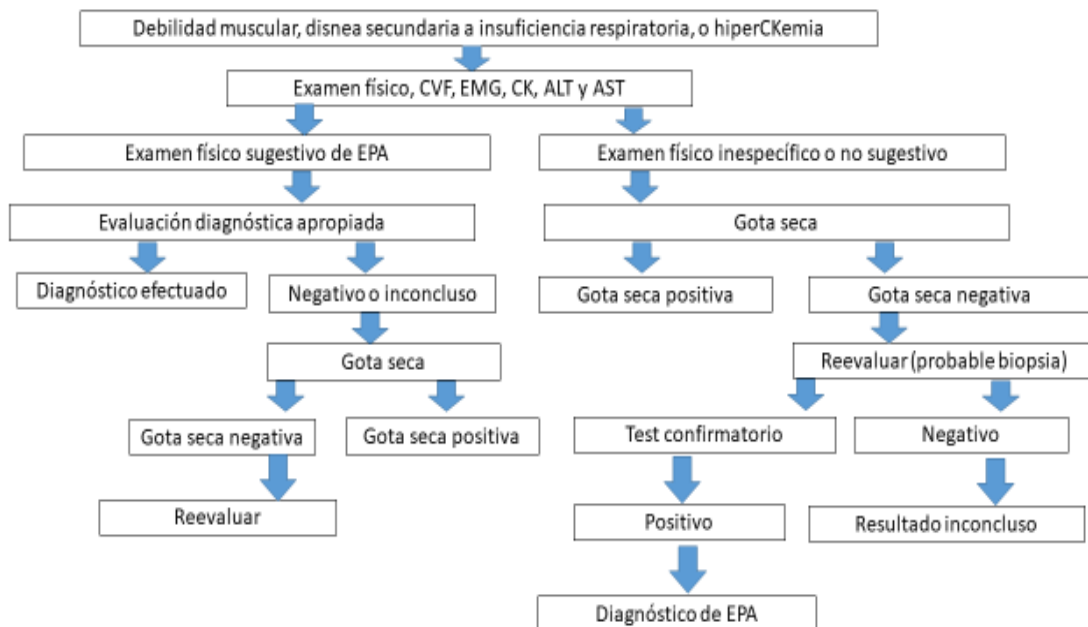
Este estudio es el último punto para llegar a un diagnóstico. Habitualmente, se utiliza la técnica Sanger que, al encontrar dos mutaciones, permitiría llegar al diagnóstico definitivo. En el caso de encontrar una sola mutación con una gota seca positiva, sería

recomendable efectuar cultivo de fibroblastos, ya que es la técnica de elección. Por otra parte, existe la posibilidad de encontrar una actividad reducida de GAA, sin que haya enfermedad de Pompe. Esta situación se denomina pseudodeficiencia. Su diagnóstico se efectúa mediante técnica Sanger, debiéndose objetivar un alelo característico de pseudodeficiencia(74)(75). Esto es más frecuentes en asiáticos. Las mutaciones implicadas con mayor frecuencia son c.1726G>A , G576S; c.2065G>A, y E689K.



**Fig. 8. Screening de gota seca en EPA. Modificado de Vissing et al(76)**

En conclusión, la presencia de debilidad muscular con fenotipo compatible, hiperCKemia y/o declinación de la función respiratoria, deberían generar la sospecha de EPA y, a continuación, la toma de gota seca.



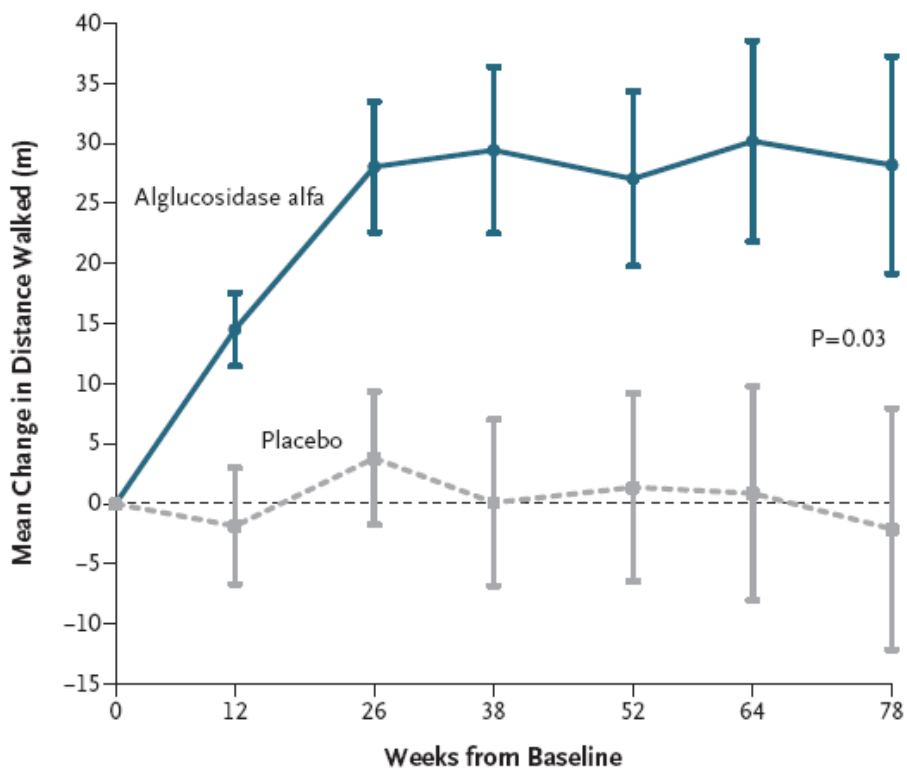
**Fig.9. Algoritmo diagnóstico de EPA. Modificado de Al Jasmi(41)**

### 1.1.6 Tratamiento

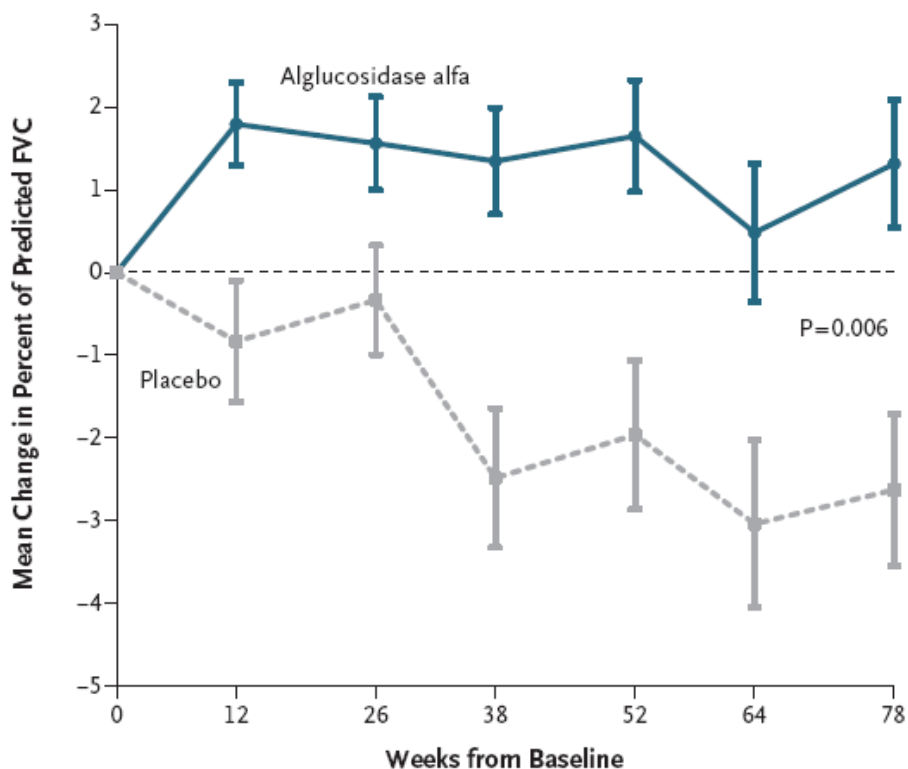


La terapia de sustitución enzimática ha ido desarrollándose en los últimos 20 años, efectuándose los primeros estudios en las formas infantiles y, a posteriori, en adultos. Estos primeros estudios se focalizaron en el tratamiento de la miocardiopatía, apreciándose una disminución de la masa del ventrículo izquierdo con terapia de reemplazo enzimático (TRE) (77). En las formas infantiles, la respuesta de inmunidad del paciente a la nueva enzima, guarda una relación estrecha con la mejora de la sobrevida. (78) Los pacientes CRIM (cross reactive immune material) negativo no expresan GAA nativa, por lo que su sistema inmune no reconoce la nueva enzima. La capacidad de efectuar una respuesta inmune efectiva atenta en las formas infantiles contra el tratamiento(79), lo cual obliga a asociar terapia inmunomoduladora al TRE.

En EPA, el estudio LOTS (Late Onset Treatment Study) demostró el efecto de la enzima recombinante alfa-glucosidasa ácida en 90 pacientes en un período de 78 semanas, evidenciando una mejora significativa en el 6-MWT, así como una estabilización de la función respiratoria(80).



**Fig.10. Cambio en 6-MWT en un período de 78 semanas, en pacientes bajo TRE vs placebo. Modificado de Van der Ploeg(80)**



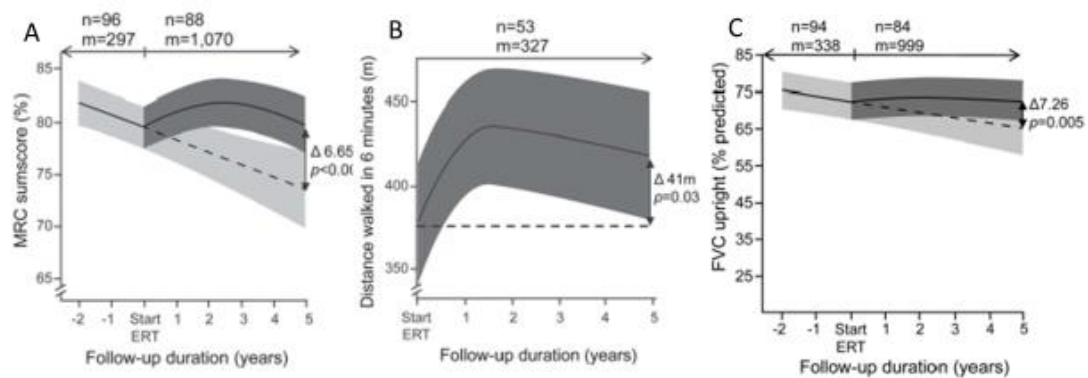
**Fig.11. Cambio en CVF en un período de 78 semanas, en pacientes bajo TRE vs placebo. Modificado de Van der Ploeg(80)**

Se han publicado numerosas series de pacientes analizando de forma retrospectiva la respuesta a largo plazo a la TRE. Recientemente, un meta-análisis de 22 publicaciones de 438 pacientes bajo tratamiento, seguidos por un promedio de 45 meses, evidenció que la mortalidad de los pacientes tratados era cinco veces menor que la de los pacientes no tratados(81). La CVF mejora rápidamente al iniciar la TRE en los dos primeros meses, seguido de una lenta declinación en los siguientes tres años. En relación al 6-MWT, la mayor mejora se logra en los primeros 20 meses, con una estabilización posterior.

Kuperus et al han analizado, en forma prospectiva, el beneficio del TRE a largo plazo. En una cohorte de 102 pacientes, se evidenció una mejora de la fuerza muscular principalmente en los primeros 2 a 3 años de tratamiento, así como de la capacidad pulmonar o en las escalas de actividades de la vida diaria (82); sin embargo, se objetiva una disminución de esta mejora en adelante. A pesar de esto últimos, el resultado es siempre mejor en todos los pacientes que no haber recibido tratamiento.

Esta tesis doctoral se basa en una cohorte muy numerosa de pacientes con EPA, habiendo recibido un gran número de ellos TRE por más de 5 años. Probablemente pueda aportar información clínica relevante sobre la historia natural de la enfermedad, la cual asumimos profundamente modificada gracias a la TRE. Hay pocas series que

analicen pacientes con tratamiento por largos períodos, por lo que podría redundar en información relevante para el conocimiento de la efectividad del mismo. En particular, creemos que es muy importante definir el grado de compromiso para la ejecución de tareas de la vida diaria en pacientes tratados con TRE por largos períodos de tiempo, más allá de los tests funcionales, para definir el compromiso en el día a día.



**Fig. 12. Evolución de la enfermedad comparando tratados vs. no tratados, acorde fuerza muscular (A), 6-MWT (B) y CVF (C). Modificado de Kuperus (82)**

El Pompe Registry (83)(84) es una gran herramienta en el seguimiento de los pacientes con TRE, habiéndose registrado ya más de 1000 pacientes en todo el mundo. Este registro ha dado información relevante sobre evolución de los pacientes, brindando información sobre su estabilización inicial y deterioro posterior. El reconocer que la historia natural, ya modificada por la TRE, no muestra una evolución uniforme, nos plantea la necesidad de disponer de biomarcadores que informen sobre pronóstico de los pacientes y respuesta a la TRE.

Una vez efectuado el diagnóstico de EPA, el tratamiento debe ser iniciado si el paciente presenta síntomas (41,85,86). En pacientes presintomáticos, la TRE no es necesaria en la actualidad. La dosis de alfa-glucosidasa es de 20 mg/kg administrada cada 2 semanas por vía endovenosa(80). Las reacciones adversas son muy poco frecuentes, destacando como serias la anafilaxia y reacciones alérgicas severas.

El seguimiento de los pacientes bajo TRE debería incluir un control clínico cada seis meses desde el inicio de la infusión, que abarque (41,87):

- medición de fuerza manual mediante escala MRC (flexión y extensión cervical, abducción hombros, flexión y extensión codo, flexión y abducción cadera, flexión y extensión de rodillas y pie)

- medición de fuerza cuantitativa: si disponible, se puede utilizar dinamómetro de mano

-capacidad vital: CVF mediante espirometría, para valorar debilidad diafragmática. Si la hubiere, corresponde estudiar PIM y PEM.

-6-MWT

-medición de escalas de vida, preferentemente el formulario SF36

-laboratorio: cada 3 meses, efectuar CK, ALT y AST

-acorde síntomas, efectuar ECG, ecocardiograma, densitometría ósea y audiometría

## 1.2 Acerca de de la RNM muscular en enfermedades musculares

### 1.2.1 RNM muscular cualitativa

El estudio de las enfermedades neuromusculares mediante técnicas de imágenes ha tenido un fabuloso desarrollo en los últimos años(88). La clínica y la electromiografía, junto con las imágenes musculares, asociados a la biopsia muscular y la genética, facilitan el diagnóstico de este tipo de trastornos. Desde un punto de vista práctico, las imágenes permiten dos objetivos: definir el músculo candidato a biopsiar (89), y facilitar el diagnóstico genético de la enfermedades a partir de la identificación de patrones característicos de infiltración grasa muscular(90). La tomografía computada, históricamente utilizada en estas enfermedades, le está dando paso progresivamente a la RNM muscular como método diagnóstico, debido a la ausencia de radiaciones ionizantes en esta última y a una mejor definición anatómica.

Una ventaja importante de la RNM muscular radica en la capacidad de detectar cambios específicos atribuibles a enfermedades puntuales mediante la utilización de secuencias específicas. Mediante la secuencia T1W se pueden detectar signos tempranos de reemplazo grasa, los cuales se relacionan con pérdida de fuerza muscular(91,92)(93) . Las secuencias como T2W con supresión grasa o la secuencia STIR (short-tau inversión recovery) permiten detección de edema muscular. Este edema no es específico de enfermedad muscular, pero puede preceder el daño tisular establecido o la inflamación. También se puede objetivar edema tras trauma muscular, rabdomiólisis, denervación, o infecciones.

Dado que estas dos secuencias no son cuantitativas per se, se han creado escalas para cuantificar la presencia de grasa o de edema. En la actualidad, la escala semicuantitativa más utilizada para definir el grado de reemplazo grasa es la escala de

Mercuri, modificada por Fischer(94)(95). Esta escala puntúa del 0 al 5 (0: apariencia normal; 5; reemplazo graso completo).

Tabla 2. Escala de Mercuri para infiltrado grado en T1W

<b>Grado</b>	<b>Características</b>	<b>Porcentaje de músculo comprometido</b>
<b>1. Normal</b>	Músculo normal	0%
<b>2. Leve</b>	Aspecto apolillado, con focos dispersos de infiltración grasa	<30%
<b>3. Moderado</b>	Infiltrado graso confluyente	30-60%
<b>4. Severo</b>	Compromiso difuso	>60%

Escala de Mercuri (94) para evaluación de reemplazo graso en músculo estriado.

En lo que respecta al edema, también se ha desarrollado una escala visual, que se corresponde 0 con ausencia de edema, 1 con edema leve, y 2 con edema definitivo (96). La utilización de RNM corporal total (WBMRI: whole-body MRI) ha demostrado ser una excelente técnica para estudiar tanto los músculos de extremidades inferiores, como otros más inaccesibles (ej: musculatura paravertebral). Esta técnica se utilizaba inicialmente para estudio de metástasis(97). En el campo de las enfermedades neuromusculares, hay estudios que abarcan una enorme gama de patologías, desde miopatías miofibrilares(98) a disferlinopatías(99). Siempre que sea posible, es de elección efectuar WBMRI.

La decisión de qué músculos estudiar debe ser analizada en cada paciente en particular, pero debería abarcar, al menos, secuencias en T1W de musculatura paraespinal, cintura pélvica, muslos y piernas. Si la sospecha incluye miopatía inflamatoria, debería abarcar una secuencia STIR. En estadios finales, es habitual el reemplazo graso de la totalidad de la musculatura. Si con las secuencias habituales no se obtiene la información deseada, se puede ampliar el área de búsqueda mediante un protocolo de WBMRI.

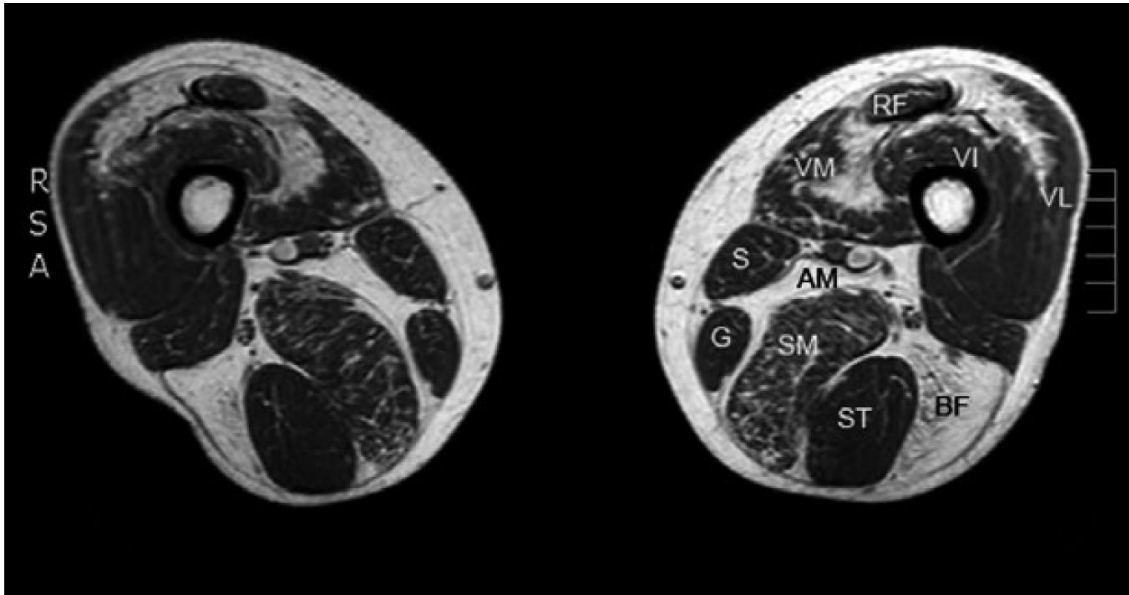


Fig. 13. RNM muscular en distrofinopatía. Imagen axial en T1W del muslo de un paciente con distrofia muscular de Becker. RF:rectus femoris; VM: vastus medialis; VI: vastus intermedius; VL: vastus lateralis; S: sartorius; G: gracilis; AM: adductor magnus; SM: semimembranosus; ST: semitendinosus; BF: biceps femoralis. *Modificado de Ten Dam et al(88)*



Fig. 14. Miopatía por colágeno VI. WBMRI T1W en cortes frontal (A) y axiales (B-G). GLU: glúteos; DEL: deltoides; T: tríceps; RF: rectus femoris; VL: vastus lateralis; RIM: en inglés, ribeteado, típico y específico de esta miopatía. *Modificado de Quijano-Roy(100)*

### 1.2.2 RNM cuantitativa

Mientras la RNM cualitativa, con secuencias como T1W, tiene un rol definido en el diagnóstico de las enfermedades musculares, la RNM cuantitativa (qMRI, del inglés quantitative MRI) utilizando secuencias 3-point Dixon o water T2, está adquiriendo valor como método de seguimiento de los pacientes, tanto para estudios de historia natural de las miopatías como para respuesta a tratamientos en ensayos clínicos. La relativamente lenta evolución de estas enfermedades, con las dificultades inherentes para encontrar cambios en pruebas funcionales en forma prospectiva en cortos períodos de tiempo, la dificultad para el reclutamiento de pacientes con enfermedades raras, y la necesidad de colaboración en pacientes poco colaboradores (ej niños) en las pruebas funcionales motoras, abren un marco de posibilidad para la utilización de qMRI.

La qMRI es una técnica no invasiva, que permite cuantificar la degeneración muscular. En este punto, el reemplazo de tejido muscular por grasa es una de las variables medibles. También se pueden medir el grado de edema, atrofia o hipertrofia muscular. qMRI disminuye el bias entre distintos observadores, con una excelente reproducibilidad(101). Por otra parte, la qMRI se ha demostrado más sensible que la valoración clínica para detectar progresión de diversas enfermedades musculares(102)(92,103)(104). Utilizando técnicas cuantitativas, el número de pacientes a incluir en los ensayos clínicos podría ser sensiblemente menor (102). Mientras la secuencia 3 – point Dixon permite determinar cambios a través del tiempo, esto no ha podido ser replicado con la secuencia T1W en cortos períodos de tiempo(92,103). Una pregunta, aún no resuelta en la actualidad y que será uno de los objetivos de esta tesis, es si la RNM muscular, tanto cualitativa (T1W) como cuantitativa (3-point Dixon) puede correlacionarse con la fuerza muscular en EPA.

Las secuencias cuantitativas, como 3-point Dixon(105,106), están permitiendo cuantificar el recambio graso con una mayor fiabilidad, siendo más reproducibles y menos operador-dependientes(92). Esta secuencia se basa en una discriminación entre agua y grasa, lo que permite definir el porcentaje de grasa de cada músculo. A su vez, permitiría objetivar cambios musculares precozmente, antes que se desarrolle reemplazo graso; por otra parte, sería de gran utilidad para evidenciar daño muscular en pacientes aún asintomáticos. Un correcto posicionamiento del paciente en el equipo de RNM muscular, así como una correcta definición de los reparos anatómicos, es fundamental para asegurar la reproducibilidad tanto entre centros, como en forma prospectiva en el mismo paciente(101,107).



Los principios para la medición de grasa con secuencia 3-point Dixon han sido muy bien desarrollados por Burakiewicz et al(106). Los protones del agua y la grasa resuenan a diferentes frecuencias. Transcurrido un cierto tiempo desde el pulso de radiofrecuencia, ya que el agua y los lípidos tienen frecuencias de precesión diferentes, se generan vectores de magnetización en frecuencias opuestas. Cuando los vectores resultantes de la suma vectorial dentro de un voxel estén en fase, las señales serán sumadas; cuando la señal esté fuera de fase, permitirá distinguir agua de lípidos. Adquiriendo imágenes en dos puntos distintos de esta secuencia, utilizando esta propiedad de suma y resta de la señal, se pueden producir imágenes de pura agua y grasa. La fracción grasa es la fracción correspondiente a grasa de cada voxel, y la forma para calcularla es la siguiente:

$$\eta = \frac{S_F}{S_F + S_W}$$

siendo  $\eta$  = fracción grasa;  $S_F$  = señal grasa;  $S_W$  = señal agua(108)

Esta técnica se basa en la diferencia de fases, permitiendo adquirir imágenes en fase y fuera de fase tanto para el agua como para los lípidos. Requiere un mínimo de dos adquisiciones de datos, que se pueden extender para mejorar la señal (3-point Dixon).

Otra secuencia cuantitativa de mucho interés en la actualidad es el water T2W. Un problema de la secuencia Dixon es que puede llegar a requerir mayor tiempo para la adquisición de los datos, por el número de repeticiones en distintos cortes(109) . La combinación de la medición de PDFF (proton density fat fraction) y water T2W en una única secuencia a través de la técnica IDEAL-CMPG(110), permitiría medir grasa y agua en contexto de edema e inflamación(111).

Finalmente, merece una mención la espectroscopía para el seguimiento de enfermedades musculares. Esta técnica ha adquirido un rol cada vez más relevante como biomarcador. Los estudios más relevantes se han hecho en enfermedad de Duchenne(104,112). Permite determinar la fracción grasa de un músculo determinado, lo cual se asocia con progresión de la enfermedad y se correlaciona con el status funcional(113). Además, esta secuencia permite una separación muy clara de la señal

de agua y grasa, lo que permite una mejor definición de inflamación y daño muscular(114). La espectroscopia se considera la secuencia de elección para cuantificación de compuestos bioquímicos in vivo, y la fracción grasa intra-voxel se ha correlacionado con función muscular(114). Sin embargo, la información que provee es muy limitada en el espacio. Es por esto que el 3-point Dixon ha tenido una mayor popularidad, ya que permite analizar varios músculos a la vez, y ya ha sido validada para estudios multicéntricos. Habiendo distintos proveedores de software de espectroscopía, también se corre riesgo de falta de homogeneización entre los centros(115). Nosotros no disponíamos de esta tecnología al momento de iniciar el reclutamiento de pacientes.

Un aspecto muy importante de la secuencia Dixon es la reproducibilidad. Para este punto, es particularmente relevante la normalización de los puntos anatómicos a tomar en cuenta, ya que la distribución de grasa a lo largo del músculo puede ser inhomogénea. Se suelen hacer cortes entre 0 y 10 mm, lo que permite obtener entre 10 y 50 cortes por músculo. Si bien existen herramientas semi-automáticas para analizar volumen de músculos totales(116), estas técnicas no son efectivas para estudiar músculos individuales, por lo que se requiere análisis manual de las imágenes.

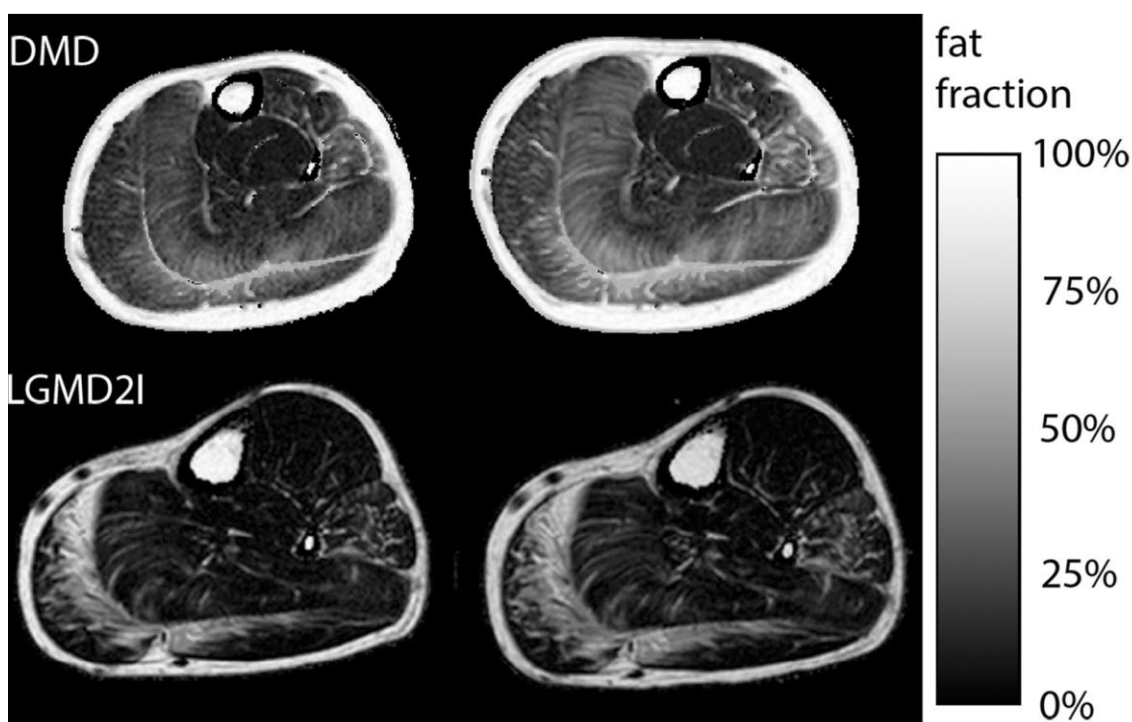


Fig. 15. Ejemplo de progresión mediante secuencia Dixon en una imagen basal (*izquierda*) y al año (*derecha*) en pierna de una paciente con distrofia muscular de Duchenne (*arriba*) y distrofia de cinturas 2I (*abajo*). La progresión es más rápida en Duchenne que en LGMD 2I (en sólo, Duchenne: de 21 a 28%; en LGMD2I, de 8 a 13%). *Modificado de Burkiewicz*(106)

En los últimos años, se ha usado en forma cada vez más extendida la secuencia 3-punto Dixon en enfermedades musculares. Estos estudios han permitido determinar el patrón de reemplazo muscular en una determinada cohorte y su variación con el tiempo. Los estudios más importantes en este punto se han efectuado con distrofinopatías. Cada enfermedad muscular puede presentar músculos que tengan tasas de deterioro más acelerado, como el caso de tibialis anterior y peroneus en Duchenne(117), o el músculo sóleo en distrofia oculo-faríngea (OPMD)(103). En líneas generales, la correlación entre tests funcionales motores y fracción grasa es buena, aunque puede variar en algunas enfermedades (117). La mayoría de los estudios prospectivos efectuados hasta la actualidad se han focalizado en la historia natural de las enfermedades (92)(102)(104)(118)(119)(120)(121)(122)(123)(124). Pocos estudios han analizado la efectividad de un tratamiento mediante qMRI, pudiendo rescatarse estudios en Duchenne (112) y EPA (125).

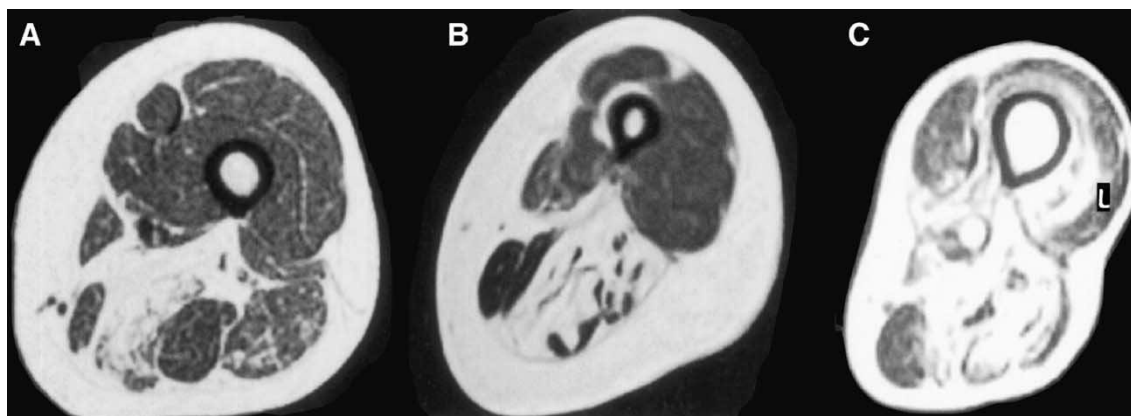
La secuencia Dixon tiene una utilidad evidente, pero no permite identificar el glucógeno muscular, lo cual sería particularmente útil en pacientes asintomáticos con glucogenosis, en los cuales la necrosis muscular sea mínima(126). Las secuencias de RNM para detectar glucógeno incluyen(13) C-MR espectroscopia, glycoCEST (*Chemical Exchange Saturation Transfer*) o MRS protónica. Esta tecnología no está disponible en los scanners regulares, ya que se suele requerir una RNM de 11 TESLAS, sólo disponible en instituciones universitarias con fines de investigación, pero no como parte de la actividad asistencial(127). Estudios efectuados en pacientes con enfermedad de McArdle y déficit de fosfo-fructokinasa, las cuales son miopatías metabólicas relacionadas con el depósito de glucógeno, evidenciaron altas concentraciones de glucógeno muscular respecto a controles(128). En relación con esta tesis doctoral, no se disponía de esta tecnología al momento del inicio del estudio.

### 1.3 Acerca de la RNM muscular en EPA

Los primeros estudios con imágenes que abarcaron EPA se efectuaron con tomografía axial computada (TAC) (129)(130), con la intención de facilitar el diagnóstico mediante la identificación de patrones específicos de compromiso muscular, en momentos en que la técnica de la gota seca no era tan accesible. En estos estudios se podía evidenciar un temprano y severo compromiso de musculatura de tronco y extremidades, con indemnidad de bíceps femoral (BF), sartorius (SA) y gracilis (GR). La TAC muscular presenta como complicación la utilización de radiaciones ionizantes en altas dosis y la mala definición de la estructura muscular.

Desde 2004, se disponen de los primeros estudios con RNM cualitativa(61). La secuencia más utilizada es T1W, con cortes a nivel de tronco y muslos inicialmente. Con la incorporación de la secuencia RNM corporal total (WBMRI), el estudio se amplió a cabeza y extremidades superiores(100).

En las fases iniciales de la enfermedad, suelen comprometerse a nivel de muslos los músculos adductor magnus y semimembranoso, con un compromiso variable del semitendinoso. En la progresión, se suele comprometer la cabeza larga del bíceps femoral, vasto intermedio, vasto medial y, en menor grado, vasto lateral. Suele haber un respeto parcial de los músculos sartorio, gracilis, y cabeza corta del biceps femoral, que se pierde en estadios avanzados, cuando el infiltrado graso puede ser total(61,71). El patrón de compromiso muscular es similar en las formas juveniles(131). El compromiso a nivel de la musculatura de tronco es relativamente precoz, con una predilección por el músculo multifidus, seguido por el oblicuo abdominal interno y el longuissimus(132).

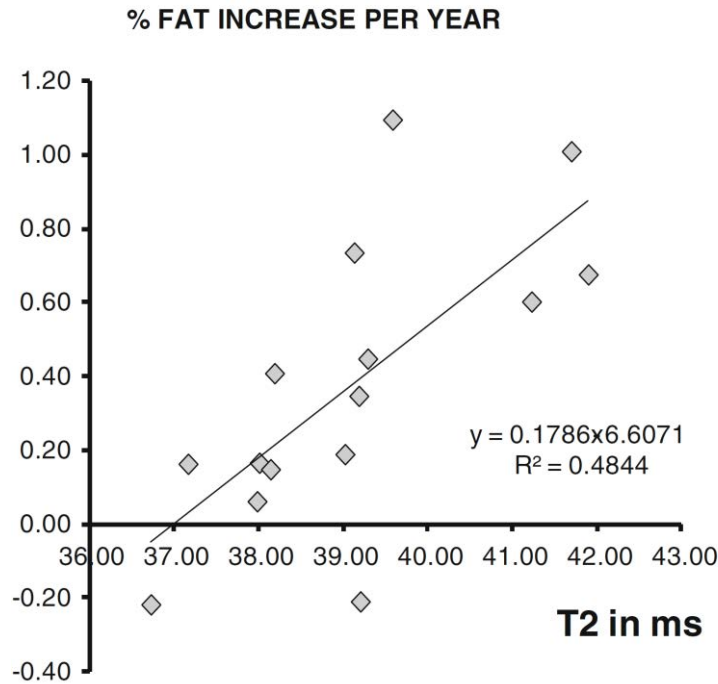


**Fig. 16. RNM muscular en secuencia T1W a nivel de muslos en EPA. En A, fase inicial de la enfermedad, con compromiso temprano del AM y ST, así como SM en menor grado. En B, fase intermedia de la enfermedad, con inicio de compromiso de VM, VI, y VL en menor grado. En C, estadios avanzados, con preservación relativa de BF, SA, GR, y reborde lateral del VL. Modificado de Pichiecchio(61)**

La WBMRI ha permitido identificar infiltración grasa en los músculos paravertebrales y de cinturas, como también en lengua(58) y músculo subescapular(71). Estos cambios se aprecian como un aumento del brillo en los músculos con reemplazo graso. A nivel de muslos, también se puede apreciar una notable heterogeneidad en el tipo y grado de compromiso muscular. Esta técnica es especialmente útil en EPA, no como método diagnóstico en todos los casos, sino en estadios intermedios, cuando hay dudas respecto a otras miopatías, sobre todo distrofias de cinturas.

Existen artículos que mencionan que la hiperintensidad en STIR en algunos músculos se podría correlacionar con acúmulo de glucógeno y retención de agua(133). Carlier et al demostraron la presencia de alteraciones de la señal en STIR-T2 en el segmento posterior de muslos en el 32% de los pacientes con EPA, todos bajo tratamiento. Se ha postulado que esta alteración de la señal podría correlacionarse con daño miocelular, pero no se ha demostrado la fisiopatogenia de este fenómeno. También se han observado cambios de la señal de STIR en pacientes juveniles (126) y en niños (134).

La qMRI ha empezado a utilizarse recientemente en el campo del EPA. La utilización de T1W en muslos con fines cuantitativos ha sido ensayada, obteniendo volúmenes de músculo y de grasa, evidenciándose un aumento de ambos ítems tras 6 meses de TRE (135). Utilizando la secuencia cuantitativa PDFF (proton density fat fraction) en WBMRI en un pequeño grupo de siete pacientes con EPA (136), se demostró que la RNM era más sensible que el examen físico en evaluar cambios en un período corto de tiempo . En forma retrospectiva, sobre un grupo de 23 pacientes (14 bajo TRE), utilizando la secuencia cuantitativa water T2, se pudo establecer un aumento promedio del 0.9% anual del infiltrado muscular graso en pacientes con EPA , a predominio de musculatura isquiotibial y aductores(125). La utilización de TRE redundó en una disminución de la tasa de infiltrado graso al 0.68% anual, en comparación con pacientes no tratados. Esto permitió demostrar que la qMRI puede ser utilizada para efectuar el seguimiento de pacientes con enfermedades tan lentamente progresivas como EPA, y brindó los primeros datos sobre la posibilidad del TRE de disminuir progresión, utilizando qMRI como biomarcador.



**Fig. 17. Correlación entre water T2 promedio y porcentaje de incremento de infiltrado graso. Modificado de Carlier(125)**

Hay muy pocos estudios utilizando qMRI en forma prospectiva para análisis del deterioro muscular en pacientes con EPA. Gruhn et al(137) evidenciaron, en un pequeño grupo de siete pacientes tratados 5 años con TRE, mediante análisis volumétricos de músculo y grasa utilizando secuencias T1W, una disminución del 6.7% del volumen del muslo y un aumento del 8.2% del volumen de las piernas. También objetivaron una correlación positiva entre el volumen de grasa basal en muslo y su incremento tras cinco años de tratamiento, si bien esta correlación no fue significativa y teniendo en cuenta la utilización de secuencias poco fiables para definir cambios cuantitativos como es el T1W.

Es absolutamente inapropiado utilizar la secuencia T1W para monitorizar la progresión de cambios crónicos degenerativos leves. Suponiendo que se pudieran clasificar a simple vista las RNM en T1W acorde la escala de Mercuri(94) graduada del 1 al 4, sin mayor dificultad, un cambio en la clasificación sólo se daría si el aumento del porcentaje graso llegara al 17.6%(133). Incluso las formas más agresivas de distrofia muscular no llegan a este grado de deterioro anual. Esta falla fue identificable con facilidad en FKRP(92) . Aún repitiendo la medición en la misma posición anatómica, seguiría siendo extremadamente operador dependiente, con una sensibilidad indeterminada, y sin posibilidad de efectuar cuantificación del porcentaje de cambio. Estudios recientes han intentado efectuar un análisis de las imágenes en T1W separando el agua y grasa en

cada voxel, sin resultados convincentes (138,139). Todos estos puntos justifican nuestra decisión de optar por la secuencia de 3-point Dixon para seguimiento.

El estudio EMBASSY(140), uno de los estudios prospectivos más importantes en EPA, analizó el cambio del contenido de glucógeno en biopsias musculares de 16 pacientes, antes y después del inicio del TRE. Se completó el estudio con análisis funcionales y qMRI. En lo que respecta a este último punto, en los cinco pacientes en los que se pudo efectuar RNM muscular con secuencia Dixon, no se detectaron cambios significativos en un período de 6 meses: es probable que el hecho de incorporar los músculos de las piernas, que no se suelen afectar en EPA, haya tenido relevancia en esta falta de significación estadística.

Es indispensable determinar la utilidad de la qMRI para seguimiento de pacientes con EPA, ya que su utilidad como biomarcador permitiría incluirla como objetivo primario en ensayos terapéuticos.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

La hipótesis de esta tesis es que la RNM cuantitativa es un biomarcador útil en el seguimiento de pacientes con EPA

### Objetivo principal

- Describir la RNM cuantitativa como biomarcador evolutivo de pacientes con enfermedad de Pompe del adulto

### Objetivo secundario

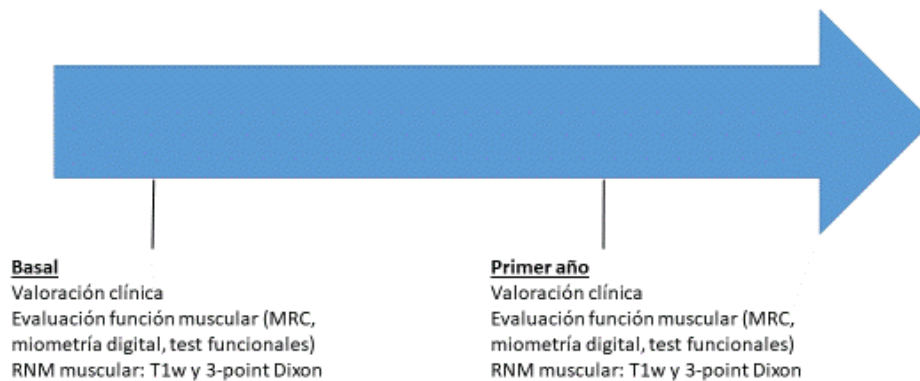
- Describir las características clínica y genéticas de una cohorte de pacientes con enfermedad de Pompe del adulto
- Establecer evolución clínica de paciente bajo terapia de reemplazo enzimático por períodos mayores a 5 años
- Describir los hallazgos de RNM muscular mediante secuencias T1W y 3-point Dixon en nuestra cohorte
- Correlacionar la función muscular con RNM muscular cuali- y cuantitativa en EPA

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Aspecto metodológico

Hemos diseñado un estudio prospectivo longitudinal de seguimiento en una cohorte de pacientes con enfermedad de Pompe del adulto. Efectuamos revisiones anuales de pacientes con EPA, que incluyen valoración clínica, función muscular, espirometría, escalas de calidad de vida y RNM muscular cuali- y cuantitativa.



**Fig. 18. Diseño del estudio prospectivo clínico e imagenológico en EPA, con variable a analizar en visitas basal y al primer año**

#### 3.2 Pacientes

Analizamos una cohorte de 34 pacientes, que incluye pacientes sintomáticos, asintomáticos y controles, en los que se analizamos sus características clínicas y radiológicas, test de calidad de vida, función respiratoria, la correlación entre RNM cuali- y cuantitativa con tests de función muscular, así como la evolución de todas estas variables en un período de un año.

Los criterios de inclusión para este estudio fueron los siguientes:

- 1) Diagnóstico de EPA basado en las recomendaciones recientemente propuestas del Consorcio Europeo de Pompe: reducción de actividad enzimática en leucocitos, fibroblastos y tejido muscular esquelético, y/o por la presencia de dos mutaciones en el gen GAA(85).
- 2) Ausencia de contraindicaciones para RNM
- 3) Inicio de síntomas después de los 18 años de edad.
- 4) Deseo de completar todos los test musculares, valoración respiratoria, y escalas de calidad de vida.

Todos los participantes firmaron un consentimiento informado. El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) en

Barcelona. Este estudio está registrado en la webpage ClinicalTrials.gov con el identificador NCT01914536.

### 3.3 Valoración clínica

Obtuvimos datos concernientes a características epidemiológicas de la cohorte, así como estado médico general y situación clínica al momento de la visita inicial y en la visita de seguimiento al año.

Se recolectaron datos, tanto en forma presencial como por entrevista telefónica, sobre edad de inicio de los síntomas, edad a la que se efectuó el diagnóstico, así como edad al inicio del tratamiento. Evaluamos el impacto de la enfermedad en el estado funcional de los pacientes. Se obtuvo información respecto a capacidad de efectuar diferentes actividades como correr, caminar, subir escaleras o levantarse de una silla, al momento del inicio de la TRE y en la visita basal.

Recabamos información en lo referente al momento en que empezaron a usar dispositivos de soporte como bastones o sillas de ruedas. También obtuvimos información clínica relevante sobre síntomas respiratorios, así como sobre la utilización de ventilación mecánica invasiva y no invasiva.

### 3.4 Genética

Para cada uno de los pacientes, se efectuó un estudio genético para definir las mutaciones presentes en ambos alelos. En el análisis se incluyeron más de 400 diferentes mutaciones reconocidas en el gen de *GAA*, incluyendo mutaciones missense (cambio de sentido), nonsense (sin sentido), en el sitio de splicing, deleciones parciales e inserciones a lo largo de todo el gen (141,142). Siendo una enfermedad genéticamente heterogénea, las distintas mutaciones tienen distintos efectos: las mutaciones missense generan cambio de codones, las mutaciones nonsense producen codones de parada, las deleciones y las inserciones redundan en alteraciones del marco de lectura, produciendo codones de parada prematuros y proteínas truncadas, mientras que las mutaciones en el "splicing" (empalme) llevan a alteraciones del procesamiento del mRNA. (142)

### 3.5 Valoración función muscular

Dos fisioterapeutas expertas en enfermedades neuromusculares evaluaron la función muscular mediante los siguientes tests: test de marcha de 6 minutos (6MWT, en inglés), tiempo para caminar 10 metros, tiempo para levantarse y marchar, tiempo para subir y

bajar 4 escalones, y medición de actividad motora en 20 items (MFM-20)(143). Todas las pruebas funcionales se efectuaron en el hospital de Sant Pau. Las actividades de la vida diaria se registraron mediante el Activlim-test, y la calidad de vida se registró utilizando los cuestionarios INQoL y SF36(144).

La fuerza muscular fue registrada utilizando tanto la escala manual MRC (Muscle Research Council), como mediante miometría digital. La escala MRC, que gradúa la fuerza muscular desde 0 (ausencia de movimiento) a 5 (fuerza normal), se usó para valorar flexión y extensión cervical, abducción del brazo, flexión y extensión del codo, flexión y extensión de dedos, flexión, extensión, aducción y abducción de caderas, flexión y extensión de rodillas y, finalmente, flexión, extensión, inversión y eversión de pies. La flexión y extensión de tronco, que habitualmente no se analiza mediante la escala MRC, fue caracterizada de la siguiente manera: 0: ausencia de movimiento muscular; 3: contracción muscular inefectiva; 5: contracción muscular normal. Definimos el score MRC total como la suma del score MRC de cada función muscular analizada. Mediante la miometría digital, analizamos las siguientes funciones musculares: flexión de cuello, abducción de brazos, flexión y extensión de codos, flexión, extensión, aducción y abducción de caderas, flexión y extensión de rodillas. Estos estudios se efectuaron sólo en el lado dominante. Un score de miometría digital se generó del agregado de scores de cada función muscular.

Usando espirometría convencional, se obtuvo registro de capacidad vital forzada sentado (CVFs), capacidad vital forzada acostado (CVFa), presión inspiratoria máxima (PIM) y presión espiratoria máxima (PEM), usando un espirómetro Carefusion Microlab ML 3500 MK8 (Carefusion, Yorba Linda, CA, USA).

Efectuamos un análisis de sangre a todos los pacientes para medir el valor de CK antes de la evaluación fisioterápica. Los valores normales de CK en nuestro laboratorio son de menos de 174 U/l

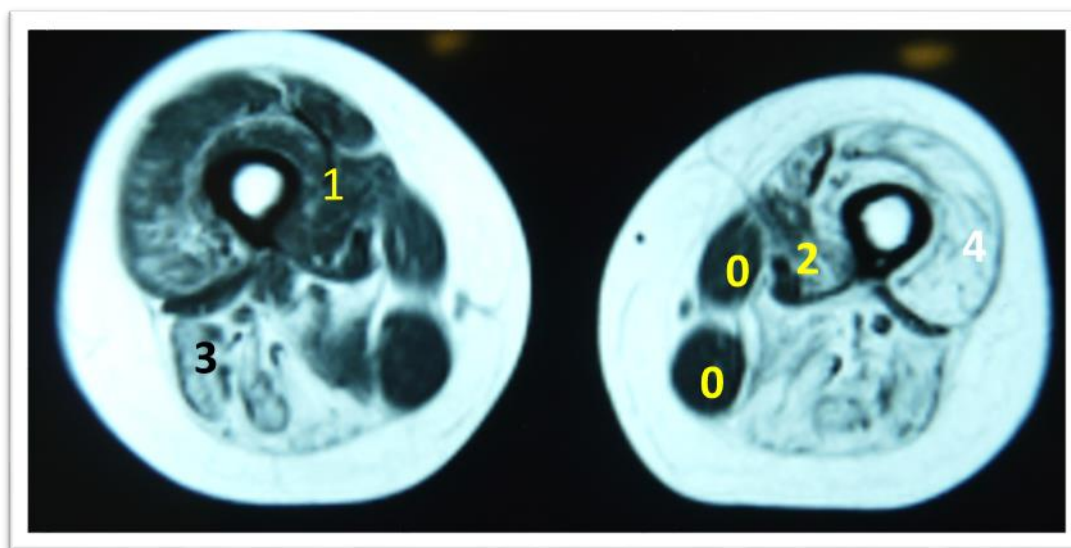
### 3.6 RNM muscular

La RNM muscular corporal total (WBM MRI) fue efectuada con un equipo Philips Achieva XR 1.5 TESLA en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Utilizamos el mismo protocolo de posicionamiento para todos los pacientes: posición supina con piernas flexionadas, la rótula orientada hacia arriba y los tobillos en posición neutral. Imágenes en T1w turbo spin echo se obtuvieron mediante los siguientes parámetros de adquisición: TR=757 ms, TE = 17 ms, grosor = 8 mm, número de cortes = 164, FOV = 530 x 530 mm, tamaño de adquisición del voxel = 1.6 x 2.88 mm. Las imágenes en 3-point Dixon se adquirieron en 3D mediante los siguientes parámetros de adquisición: TR/TE = 5.78/1.8, 4 ms,

ángulo de inclinación = 15 grados, FOV = 520 x 340 x 300 mm, tamaño del voxel = 1 x 1 x 3 mm de cada muslo y FOV = 520 x 320 x 200 mm y tamaño del voxel = 1.3 x 1.7 x 5 mm para el tronco inferior. Las imágenes de agua y grasa se obtuvieron automáticamente de la adquisición Dixon. El tiempo para obtener las imágenes fue de 45 minutos por paciente.

Fue cuantificado el infiltrado muscular graso en secuencia T1w usando la versión modificada del score de Mercuri publicado por el grupo del dr Fischer (145):

- *Músculo normal*: 0 puntos
- *Leve*: trazos de aumento de la intensidad de la señal en secuencias T1w: 1 punto
- *Moderado*: aumento de intensidad de señal en T1w con confluencia menor al 50%: 2 puntos
- *Severo*: aumento de intensidad de señal en T1w con confluencia mayor al 50%: 3 puntos
- *Estadío final*: totalidad del músculo reemplazada por tejido conectivo y grasa con aumento de densidad: 4 puntos



**Fig. 19.** Ejemplo de estadificación de infiltrado graso muscular acorde escala de Mercuri. 0: normal; 1: trazos de aumento de señal; 2: confluencia grasa < 50%; 3: confluencia grasa > 50%; 4: reemplazo graso total

Cada músculo fue evaluado en ambos lados. Fue generado un score de músculos mediante RNM que se calcula sumando el valor obtenido al analizar cada músculo. Este valor varía desde 0 (valor más bajo, todos los músculos son valorados como 0) a 290 (valor más elevado, todos los músculos son valorados como 4)

Para analizar las imágenes del 3-point Dixon efectuamos el análisis de cinco cortes transversales a nivel de muslo y tronco inferior, en los cuales había el mayor volumen

muscular. Los músculos analizados fueron recto femoral, vasto intermedio, vasto lateral, vasto medial, aductor magno, sartorio, gracilis, semitendinoso y semimembranoso; con tres cortes se analizaron la cabeza corta del bíceps femoral, cabeza larga del bíceps femoral y aductor longus. Finalmente, se analizaron psoas y musculatura paraespinal lumbar. Utilizamos un marco anatómico preciso para otorgar consistencia a la comparación entre RNM muscular basal y al año: tomamos como referencia el último corte en el cual se observa la cabeza corta del bíceps femoral, y se analizó cada músculo cada 5 cms cubriendo todo el muslo. Las imágenes fueron analizadas por dos investigadores independientes (SF y JDM). Fueron mapeados tanto la totalidad del corte muscular, como los correspondientes a cada músculo, estableciéndose la fracción grasa correspondiente.

Se estimó el porcentaje de grasa muscular mediante la plataforma PRIDE (Philips Research Image Development Environment) la cual permite el análisis de las imágenes en 3-point Dixon.

Para calcular la fracción grasa, una ROI (región de interés, en inglés región of interest) fue dibujada tanto en las imágenes de grasa como de agua, sobre el músculo seleccionado. El coeficiente de fracción grasa fue definido como  $\text{grasa} / (\text{grasa} + \text{agua})$  donde la grasa y el agua son los valores de intensidad en el ROI para las imágenes de grasa y agua, respectivamente. De estos dos parámetros, y asumiendo que el contenido de agua corresponde principalmente a músculo, el área de grasa y músculo fue calculada. Los valores acumulados de todos los cortes fueron computados como un índice, así como la fracción grasa muscular (FF, en inglés muscle fat fraction), el cual se calculó de la siguiente manera:  $\text{FF} = (\text{área de grasa} \times 100) / \text{área de músculo}$ . Una vez obtenidos los valores de cada músculo calculamos el porcentaje de grasa muscular:  $\text{FF}_{\text{muslo}} = (\text{suma del área grasa de todos los músculos de los muslos} \times 100) / \text{suma del área de músculo de todos los músculos del muslo}$ .

El tiempo promedio para cuantificar la fracción grasa de las imágenes en 3-point Dixon fue de 60 minutos. Un alto grado de reproducibilidad se verificó entre los investigadores. El coeficiente ICC fue 0.982 (IC 0.977 – 0.987)

### 3.7 Heatmaps

Para representar la distribución de la debilidad muscular y el infiltrado muscular acorde a la escala de Mercuri en T1W, efectuamos heatmaps utilizando el programa de software R. Para facilitar la comprensión visual y dibujar una suerte de huella digital tanto de la debilidad muscular como del infiltrado graso en T1W, fueron alistados en columnas los 20 movimientos musculares estudiados (usamos la escala MRC para categorizar cada

valor) y los 26 músculos de extremidades superiores, tronco y cabeza, así como los 31 de extremidades inferiores, respectivamente. Los movimientos analizados, así como los músculos estudiados en T1W, corresponden con el lado dominante. El orden de los pacientes en el heatmap se estableció por un programa estadístico (mientras más similares los scores, más cercanos estaban los pacientes), y se obtuvieron dendogramas, los cuales conectaban a pacientes con hallazgos similares.

### 3.8 Estadística

Los estudios estadísticos fueron efectuados utilizando SPSS® software versión 21 de IBM®. Utilizamos el test U de Mann-Whitney para investigar si había diferencias significativas en las variables entre los grupos de pacientes sintomáticos vs asintomáticos. La correlación de la medición de la fracción grasa entre dos investigadores distintos (SF y JDM) requirió la utilización del coeficiente de correlación intraclass (IIC) para el análisis de la RNM muscular cuantitativa. Utilizamos el test Wilk-Shapiro para saber si las variables estaban distribuidas normalmente. Usamos test paramétricos para el análisis de las variables distribuidas normalmente y test no paramétricos para el análisis de variables distribuidas anormalmente. Para investigar si hay relación entre las escalas de función muscular y los hallazgos de RNM muscular usamos la correlación de Spearman (coeficiente reportado como  $\rho$ ). Usamos el test de pares de Wilcoxon para investigar si había diferencias significativas en los test de función motora, espirometría, escalas de calidad de vida y medición de la fracción grasa obtenidos mediante RNM cuantitativa entre las visitas basales y al año. Consideramos que la correlación fue buena si P fue menor que 0.05 y  $\rho$  fue de 0.65 o mayor. Como efectuamos correlaciones múltiples, un test de Bonferroni fue efectuado para evitar los errores tipo 1. Una curva ROC fue efectuada para estudiar si la fracción grasa del muslo permite diferencias entre pacientes sintomáticos y asintomáticos con alta sensibilidad y especificidad.



# **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características clínicas y genéticas de la cohorte

Se incluyeron 34 pacientes con un diagnóstico de EPA (Tabla 3)

Tabla 3. Lista de pacientes participantes en el estudio

N	Sexo	Edad (años)	Fenotipo	Gen GAA		CK (U/l)	TRE	Edad al TRE (años)	Dependiente de silla de ruedas	Dependiente de VNI
				Mut 1	Mut 2					
1	F	50	Debilidad proximal EEII + axial	IVS1-13T>G	c.1076-1G>C	251	Si	47	N	N
2	F	48	Debilidad proximal EESS e II + axial + insuficiencia respiratoria	IVS1-13T>G	c.2173 C>T	779	Si	39	S	S
3	F	26	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	779	No	-	N	N
4	F	63	Debilidad proximal EEII + axial	IVS1-13T>G	c.2600_2604delTGCTG insA	311	Si	59	N	N
5	M	11	HiperCKemia	....	.....		No	-	N	N
6	F	45	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	C.1532 C>A	322	Si	42	N	N
7	F	51	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	c.236_246delC CACAC AGTGC	240	Si	47	N	N
8	M	66	Axial + insuficiencia respiratoria	IVS1-13T>G	c.1933 G>T	406	No	-	N	N
9	F	59	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	c.1637A >G	341	Si	52	N	N
10	F	55	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	c.2173 C>T	359	Si	48	N	N
11	M	42	Debilidad proximal EEII + axial + insuficiencia respiratoria	IVS1-13T>G	.....	606	Si	39	N	S
12	F	31	Debilidad proximal EESS e II + insuficiencia respiratoria	IVS1-13T>G	c.1637A >G	391	Si	24	S	S

13	F	46	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	C.1192 dupC	396	Si	39	N	N
14	M	47	Debilidad proximal EEII + insuficiencia respiratoria	c.2173C>T	c.2173 C>T	508	Si	45	N	S
15	M	51	Debilidad proximal EEII + insuficiencia respiratoria	IVS1-13T>G	c.1657 C>T	709	Si	45	N	S
16	F	51	Debilidad proximal EESS e II + insuficiencia respiratoria	IVS1-13T>G	c.1657 C>T	458	Si	46	N	S
17	M	22	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1781 G>A	1268	No	-	N	N
18	M	49	HyperCKemia	c.271G>A	C.2510 G>A	641	No	-	N	N
19	M	14	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.573C>A	660	No	-	N	N
20	F	65	Debilidad proximal EEII + insuficiencia respiratoria	c.1781G>A	c.1194+5G>A	68	Si	64	N	N
21	F	35	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	M1L(1A>T)	355	Si	29	N	N
22	F	40	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	c.1889 -1G>A	831	No	-	N	S
23	F	52	Debilidad proximal EEII + insuficiencia respiratoria	c.1781G>A	c.1194+5G>A	907	Si	45	N	N
24	M	64	Debilidad proximal EESS e II + axial + insuficiencia respiratoria	IVS1-13T>G	Exon 18 deletion	430	Si	57	N	S
25	M	8	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889 -1G>A	1077	No	-	N	N
26	F	57	Debilidad proximal EEII + insuficiencia respiratoria	IVS1-13T>G	c.1447 G>T	394	Si	55	N	S
27	M	46	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	C.1532 C>A	882	Si	43	N	S
28	M	51	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	c.1933 G>T	952	Si	51	N	S

29	M	51	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	c.1933 G>T	432	No	-	N	S
30	M	43	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	c.1408a 1410del C>T	317	Si	43	N	N
31	F	54	Axial	Gota seca	Gota seca	275	Si	48	N	N
32	M	42	Debilidad proximal EESS + II	IVS1-13T>G	c.655G >A	886	No	-	N	N
33	F	20	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1551+ 1G>A	928	No	-	N	N
34	M	50	Debilidad proximal EEII	IVS1-13T>G	c.1637A >G	492	No	-	N	S

Paciente 31: El diagnóstico fue confirmado por cuantificación enzimática en leucocitos (0.03 nmol/min/mg proteína; valores de la normalidad: 0.15-1 nmol/min/mg proteína) y fibroblastos (21.4 nmol/min/mg proteína; valores de la normalidad 400-600 nmol/min/mg proteína) ya que no se encontraron mutaciones en gen GAA. F, femenino. M, masculino

Los pacientes fueron clasificados como sintomáticos o asintomáticos acorde de la presencia de debilidad muscular en la exploración. Siete pacientes fueron considerados asintomáticos ya que sólo presentaban hiperCKemia, sin síntomas clínicos de debilidad muscular, mientras que los 27 pacientes restantes fueron considerados sintomáticos ya que presentaban debilidad. Los pacientes con hiperCKemia eran menores que los sintomáticos (21.4 años vs 50.18 años, Mann-Whitney U test,  $p < 0.001$ ) (Tabla 4). Cinco pacientes eran sintomáticos, pero aún no estaban bajo TRE.

El signo clínico más frecuente fue debilidad muscular proximal en extremidades inferiores. Sólo el 20% de los pacientes presentó problemas para levantar los brazos. Doce pacientes usaban soportes para caminar, como bastones o andadores, mientras que dos pacientes requerían silla de ruedas. Disnea de ejercicio presentaron el 60% de los pacientes, y ortopnea el 28%. Trece de los 27 pacientes sintomáticos (48.1%) requerían soporte ventilatorio, el cual era no invasivo y nocturno en doce pacientes, e invasivo en un paciente.

Siete pacientes (3 mujeres) eran asintomáticos y sólo tenían hiperCKemia. Estos pacientes fueron estudiados en unidades de enfermedades neuromusculares por niveles de CK elevados por estudios de sangre de rutina o por tener parientes diagnosticados de enfermedad de Pompe. La edad media basal de los pacientes con hiperCKemia fue 28 años (rango: 8 a 51 años).

Veintidos pacientes eran sintomáticos y estaban siendo tratados con TRE (15 mujeres, 68.2%), mientras que ninguno de los pacientes con hiperCKemia estaban bajo

tratamiento. La edad media al momento de la visita fueron 50 años (rango: 31 a 65 años). La edad media al iniciar el TRE fue  $45.7 \pm 9$  años (rango: 24 a 66 años) después de un tiempo promedio de enfermedad de 9 años (rango: 1 a 35 años). El tiempo promedio de TRE cuando los pacientes fueron estudiados fue  $4.4 \pm 1.03$  años.

En los que respecta al estudio genético, 28 pacientes (82 % de total), presentaron la inversión IVS1-13T>G en heterocigosis asociada a otra mutación en el gen GAA. La presentaron tanto pacientes asintomáticos (5/10) como sintomáticos (14/24).

Al efectuar una comparación basal respecto a tests funcionales, fuerza muscular, función respiratoria, y escalas de calidad de vida entre pacientes sintomáticos y asintomáticos, objetivamos una clara diferencia significativa a favor de los pacientes asintomáticos en todas las variables (Tabla 4).

Tabla 4 – Datos demográficos y clínicos de pacientes sintomáticos y asintomáticos con EPA

	Pacientes		
	Tratamiento con TRE	Hiperckemia	p*
Número de pacientes	22	10	
Sexo (F)	15 (68.2%)	3 (30%)	0.06*
Edad al momento del estudio (años)	50 (31-65)	28.8 (8-51)	0.04
Tiempo desde inicio de los síntomas (años)	17 (4-42)	-	
Tiempo en TRE (años)	4.3 (1-9)	-	
Soporte para caminar (n° ptes)	10	-	
Ventilación (n° ptes)	11	-	
Tiempo para caminar 10 m (s)	7.9±0.8	3.1±0.1	0.001
6 MWT (m)	394.4±32	600.3±23.8	0.0001
Tiempo para subir 4 escalones (s)	4.8±0.7	1.5±0.3	0.005
Tiempo para bajar 4 escalones (s)	3.6±0.5	1.4±0	0.007
Tiempo para levantar y pararse (s)	7.5±1.6	4.08±0.5	0.03
MRC	95±3.2	119.1±0.4	0.0001
Miometría (nm)	187.4±28	352.4±48.4	0.02

MFM-20 (score)	47.5±1.7	58.5±0.7	0.0001
CVF sentado (%)	76.8±5.1	92±3.8	0.03
CVF acostado (%)	68.1± 8.4	81±6.3	>0.05
Activlim (score)	23.1±1.2	21.8±2.3	>0.05
SF36 (score)	55.5±3.8	80.6±5.2	0.02
INQoL (score)	39.6± 18.2	17.8±19.7	0.05

El test de Mann-Whitney U se usó para determinar la presencia de diferencias significativas en variables cuantitativas en los grupos. Chi cuadrado se usó para comparar variables cualitativas. P fue considerado si el valor era menor al 0.05.

#### 4.2 Evaluación retrospectiva de respuesta al tratamiento

En orden de analizar si la respuesta al TRE era diferente entre los pacientes tratados menos o más de 5 años, analizamos un grupo de 32 pacientes tratados mediante entrevistas presenciales y telefónicas. De este grupo, 18 pacientes (56.2%) fueron tratados por menos de 5 años y 14 pacientes (45.8%) fueron tratados por más de 5 años. No encontramos diferencias significativas en cuanto a sexo, edad al momento de la entrevista, edad al comienzo de los síntomas, o tiempo desde inicio de los síntomas hasta inicio TRE entre los dos grupos, acorde lo que se informa en tabla 5.

Tabla 5 – Datos demográficos

Características demográficas	Pacientes tratados < 5 años	Pacientes tratados ≥ 5 años	Significancia estadística
Edad al momento de la entrevista, años	53.3 ± 11.6	50.2 ± 10	NS
Género femenino	50 % (9/18)	78.5% (11/14)	NS
Edad al comienzo de los síntomas, años	36.1 ± 8.1	28.9 ± 13.04	NS
Edad al diagnóstico, años	47.2 ± 12.2	39.6 ± 11.3	NS
Edad al inicio del TRE, años	50.6 ± 11.6	42.9 ± 9.9	NS
Tiempo desde inicio de síntomas a inicio TRE, años	14.3 ± 8.5	13.8 ± 10.03	NS
Tiempo bajo TRE, años	2.7 ± 1.3	7.4 ± 1.3	0.001
<b>Variables categóricas expresadas como n (%); variables continuas expresadas como media ± SD</b>			

Desde un punto de vista genético, la mutación más frecuente fue c. 32-13 T>G (IVS-1), la que se presentó en más de un 50% de los pacientes. Esta mutación se considera que produce una progresión clínica leve, pero no objetivamos que hubiera diferencias entre ambos grupos respecto a la misma. Para analizar la influencia de la genética en la respuesta al tratamiento, analizamos si la segunda mutación era nonsense o missense acorde los informado en <https://databases.lovd.nl/shared/genes/GAA>, no encontrando diferencias entre ambos grupos.

Tabla 6 - Perfil genético de 32 pacientes bajo TRE

Paciente nº	Mutación 1	Mutación 2
1	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1076-1G>C
2	ND	ND
3	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1889 -1 G>A
4	.-3213 T>G (IVS 1)	.-2600_2604delTGCTGinsA
5	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1532 C>A
6	ND	ND
7	ND	ND
8	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1637A>G
9	ND	ND
10	.-32 13 T>G (IVS 1)	.-1637A>G
11	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1637A>G
12	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1192dupC
13	.-2173 C>T	.-2173C>T
14	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1657C>T
15	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1657C>T
16	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1802C>T
17	.-271 G>A	.-2510G>A
18	.-3213 T>G (IVS 1)	.-281_282delCT
19	.-1781 G>A	.-1194+5G>A
20	ND	ND
21	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1889 -1 G>A
22	.-1781 G>A	.-1194+5G>A
23	.-3213 T>G (IVS 1)	Exon 18 deletion
24	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1889 -1 G>A
25	ND	ND
26	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1532 C>A
27	.-32 13 T>G (IVS 1)	.-1933G>T
28	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1933G>T
29	.-3213 T>G (IVS 1)	.-1408a1410delC>T
30	ND	ND

31	ND	ND
32	ND	ND

ND: no datos

Analizamos la habilidad de los pacientes para efectuar diversas actividades físicas antes del inicio del TRE y en la actualidad (Tabla 7).

Tabla 7 – Comparación entre paciente tratados con TRE por más y menos de 5 años en distintas variables de función motor

	TRE <5 años (n=18)			TRE ≥5 años (n=14)		
	Antes TRE	Presente	P	Después TRE	Presente	P
<sup>a</sup> Corre	4/14	4/14	NS	0/14	0/14	NS
<sup>a</sup> Caminar >2 kms	10/8	10/8	NS	8/6	5/9	NS
<sup>b</sup> Subir escaleras	8/10/0	8/10/0	NS	6/8/0	1/13/0	0.019
<sup>b</sup> Levantarse de una silla	4/7/3	3/8/7	NS	5/8/1	1/11/2	0.022
<sup>b</sup> Levantarse del suelo	4/9/5	3/9/6	NS	3/9/2	0/11/3	0.056
<sup>a</sup> Permanecer 30 min de pie	13/5	13/5	NS	9/5	9/5	NS
<sup>a</sup> Utilización medios de soporte	13/5	11/7	NS	13/1	5/9	0.0001
<sup>a</sup> Levantar brazos	14/4	13/5	NS	12/2	10/4	NS
<sup>a</sup> Ventilación	7/11	7/11	NS	7/7	9/5	NS

<sup>a</sup> Data expresada como SI/NO

<sup>b</sup> Data expresada como Sin problema / Soporte necesario (en un escritorio, una baranda) pero capaz de efectuarlo por su cuenta

NS: No significativo

Student T-test se usó para comparaciones

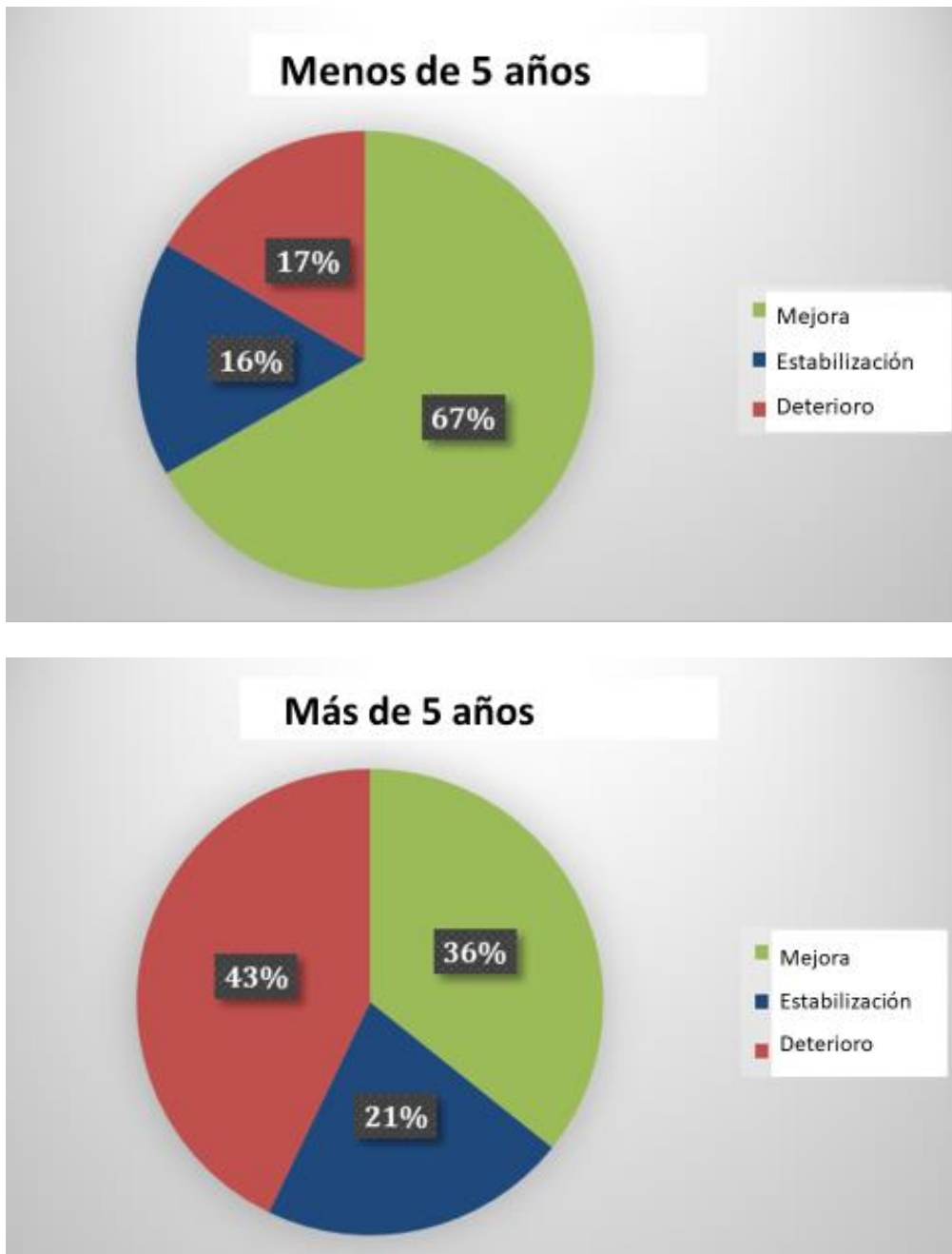


Los pacientes tratados menos de 5 años no perdieron ninguna función motora. Al contrario, observamos un declive de la función motora en paciente tratados más de 5 años, especialmente en aquellas actividades que implique efectuar esfuerzos con las piernas, como caminar, subir escaleras, o levantarse de una silla. Por ejemplo, seis de 14 pacientes eran capaces de subir una escalera sin cogerse al pasamanos antes de iniciar el TRE, mientras que sólo 1 era capaz de hacerlo tras el inicio del tratamiento. No encontramos diferencias significativas en la capacidad de efectuar tareas con las extremidades superiores antes y después del inicio del TRE.

Las diferencias en la necesidad de dispositivos para caminar entre ambos grupos fue significativa. Cinco pacientes tratados menos de seis años necesitaban ayudas para caminar antes del TRE, a pesar de que en la última visita siete pacientes en este grupo requerían un bastón o andador. En contraste, en pacientes tratados por más de cinco años sólo un paciente usaba un dispositivo para caminar antes del TRE, mientras que cinco pacientes lo requirieron después del inicio del tratamiento. Sin embargo, es importante resaltar que ninguno de los pacientes perdió completamente su capacidad de caminar, ya que todos ellos podían caminar al menos algunos metros sin ayuda y la mayoría de los pacientes podían caminar más de 500 m sin problema en ambos grupos. Los pacientes usaban silla de ruedas combinadas con otro dispositivo, como un andador o bastón.

Al momento de la entrevista, 50% (9/18) de los pacientes tratados por menos de 5 años y 64.2% (9/14) de los pacientes tratados más de 5 años tenían disnea cuando subían escaleras o subir pendientes. Ortopnea se presentó en un solo paciente tratado menos de 5 años y en dos pacientes tratados más de 5 años. 50% (9/18) de los pacientes tratados menos de 5 años requirieron asistencia ventilatoria al momento de la entrevista (7 pacientes con VNI y 2 pacientes requirieron ventilación invasiva 24 hs al día). El número de pacientes que requirieron ventilación antes y después del TRE fue la misma en ambos grupos de pacientes. 50% (7/14) de los pacientes tratados más de cinco años requirieron ventilación al momento de la entrevista, la cual fue no invasiva nocturna en todos los casos. En este grupo, dos pacientes empezaron a utilizar ventilación después del inicio del tratamiento.

Finalmente les preguntamos su opinión sobre el efecto del tratamiento en la progresión de la enfermedad (Fig 20).

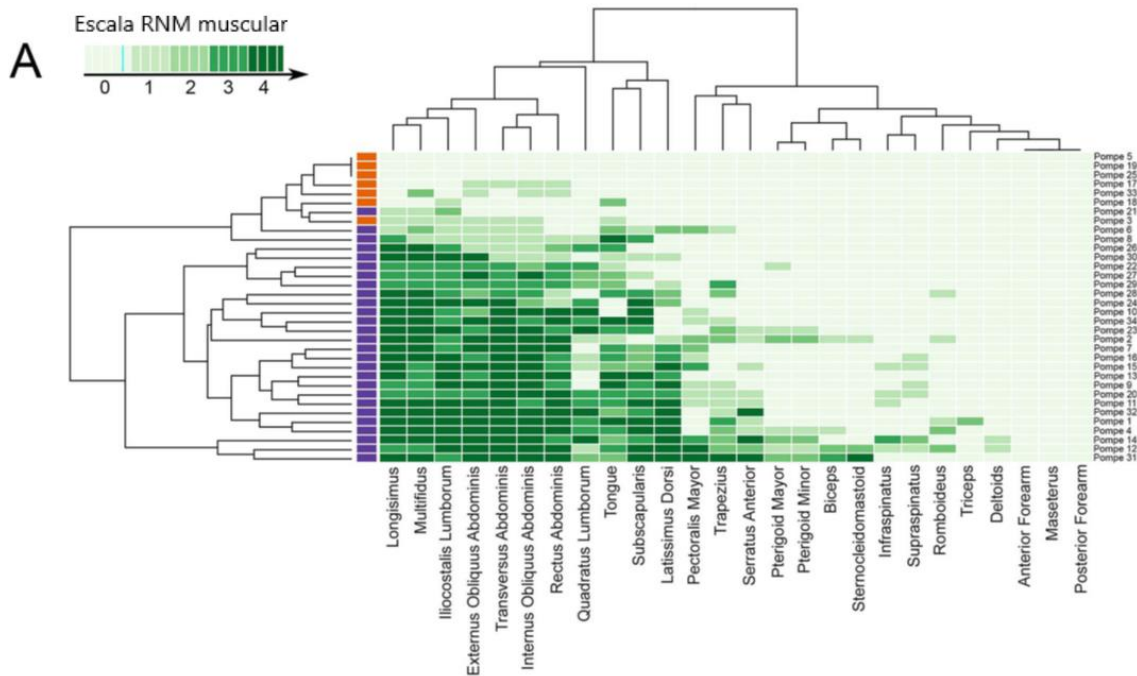


**Fig 20. Evaluación subjetiva en respuesta al tratamiento**

En el grupo de pacientes tratados menos de cinco años, 66.6% (12/18) consideró que el tratamiento mejoró su función motora, 16.6% (3/18) consideró que estaban estables y el 16.6% (3/18) evaluó que empeoró a pesar del tratamiento. En contraste, del grupo de pacientes tratados más de 5 años, 35.7% (5/14) consideró que el tratamiento mejoró su función motora, 21.4% (3/14) que estaban estables, 42.8% (6/14) consideró que empeoraban a pesar del TRE.

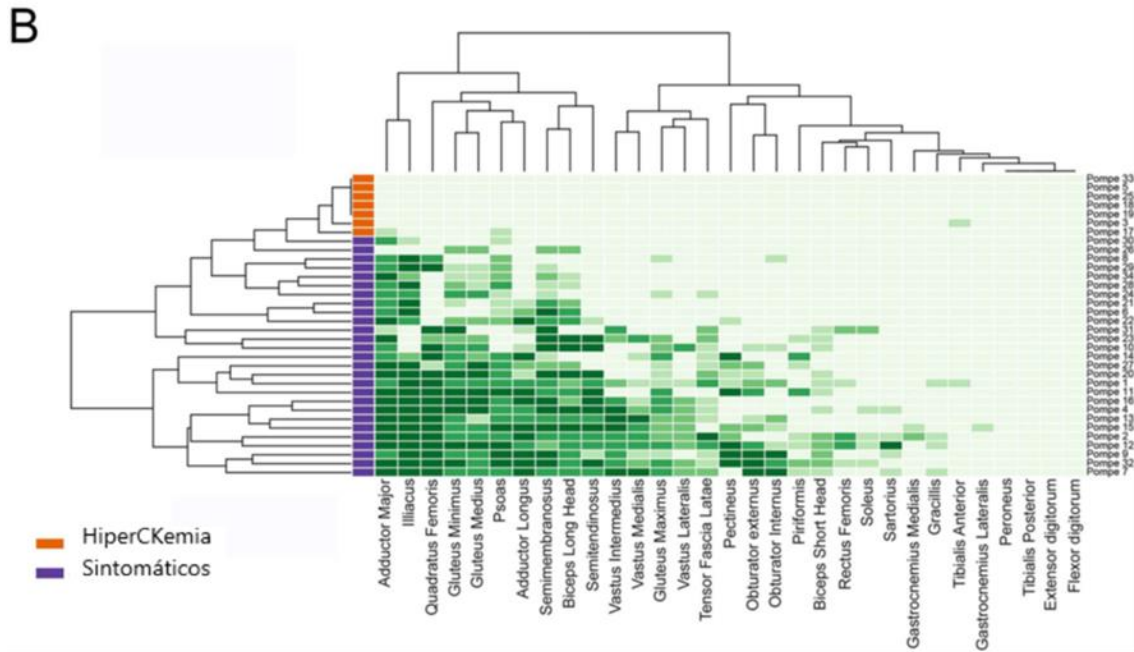
#### 4.3 Análisis transversal de RNM muscular en T1W: descripción de patrón de compromiso muscular

Efectuamos un análisis jerárquico de los valores obtenidos de la cuantificación de las RNM musculares en secuencia T1W y visualizamos dichos datos usando heatmaps.



**Fig 21. Representación del score de infiltración muscular observado en imágenes en T1 en cada músculo de cada paciente mediante heatmap. Heatmap incluyendo músculos de la cabeza, extremidades superiores y tronco. En cada heatmap, los pacientes fueron ordenados acorde un orden jerárquico con una graduación de severidad de la infiltración desde arriba hacia abajo. Los músculos (columnas) se ordenan acorde un dendrograma (parte superior de las figuras) El score de un determinado músculo en un paciente es indicado por el color del cuadrado en la interacción entre el paciente y ese músculo. Mientras más oscuro ese cuadrado, más intensa la infiltración de ese músculo.**

Nuestro análisis evidenció un compromiso evidente de la musculatura paraespinal, abdominales, lengua, *subscapularis* y *latissimus dorsi* en cabeza y tronco (Fig. 21). Los músculos de la cabeza (excepto lengua), extremidades superiores y musculatura periescapular (excepto *subscapularis*) no se vieron habitualmente comprometidos.



**Fig. 22. Heatmap incluyendo músculos de pelvis y extremidades inferiores.**

En extremidades inferiores, los músculos glúteos, *psaos*, *iliacus* y musculatura posterior de los muslos (*semitendinosus*, *semimembranosus*, *adductor major* y *longus*, así como ambas cabezas del *biceps*) se afectaron preferentemente (Fig. 22). Los músculos *glutei minor* y *medius* fueron más comprometidos que el *glutei maximus*. *Vastus intermedius* se vio como el músculo más comprometido en cuádriceps, mientras que el *rectus femoris* fue raramente afecto. En contraste, *sartorius* y *gracillis*, así como los músculos de piernas, no se vieron habitualmente comprometidos.

Observamos algunos cambios sutiles en 4 de 7 pacientes pre-sintomáticos (Fig 21 y 22). Un infiltrado graso leve (score = 1) se observó en musculatura paraespinal (*multifidus*, *longissimus*, *iliocostalis*), musculatura abdominal (*rectus abdominis*, *obliquus internus*, *obliquus externus*, *transversus abdominalis*), lengua, y *adductor major*.

Demostramos algunos ejemplos de compromiso muscular en fig. 23.

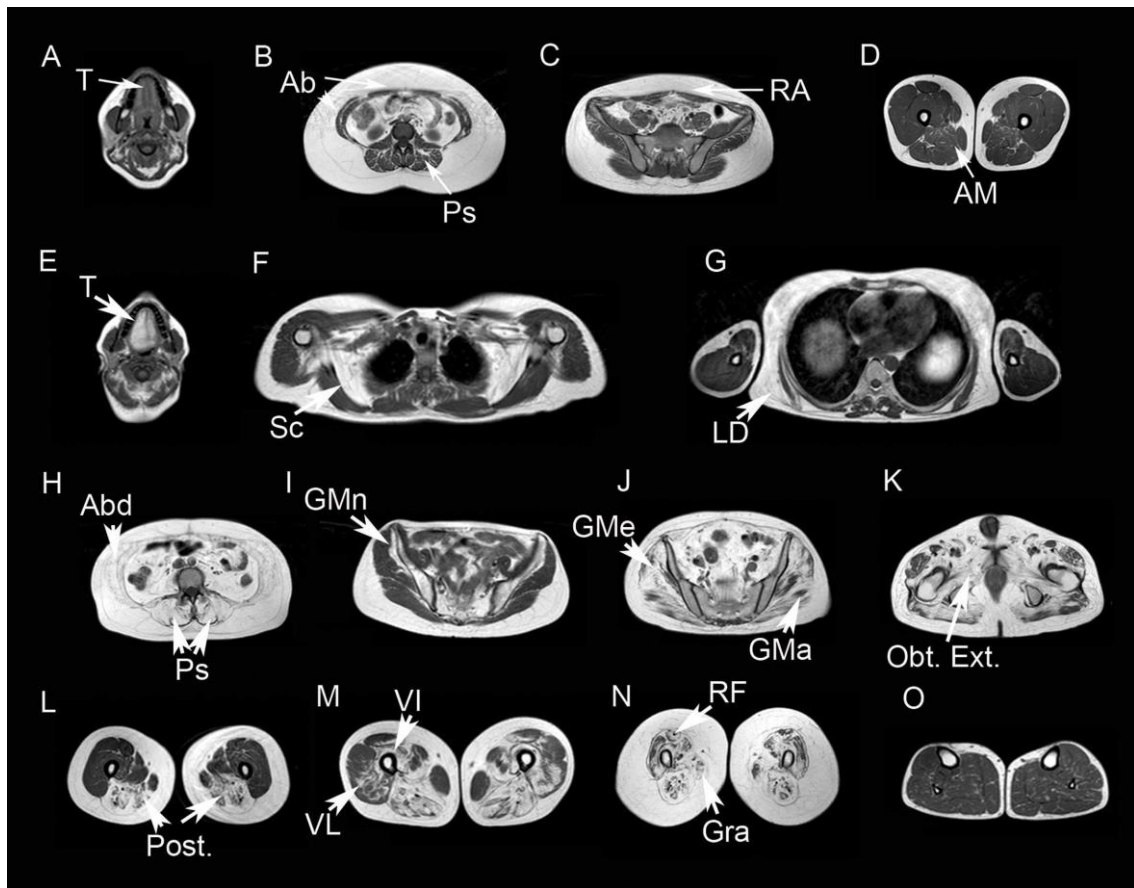
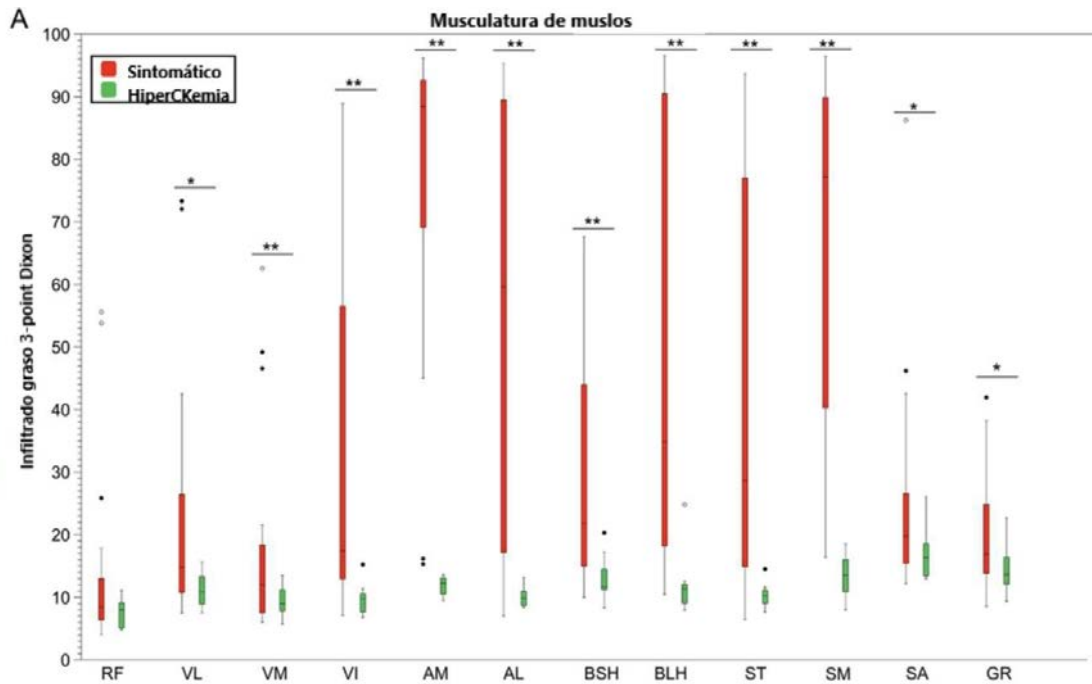


Fig. 23. RNM muscular en T1w en EPA. Observamos una infiltración muscular leve en músculos de los pacientes con hiperCKemia. Lengua (T en A), musculatura paraespinal (Ps en B), musculatura abdominal lateral (Ab en B) y *rectus abdominis* (RA en C) y en *adductor major* (AM en D). El infiltrado graso en pacientes sintomáticos fue más evidente (E-L). Los músculos más habitualmente comprometidos fueron lengua (T en E), *subscapularis* (Sc en F), *latissimus dorsi* (LD en G), la musculatura abdominal (Ab en H) y paraespinal (Ps en H), el *gluteus minor* (GMn en I), *medius* (GMe en J) y *maximus* (GMa en J), los músculos del suelo pélvico como el *Externus Obturator* (Obt. Ext. en K), los músculos posteriores del muslo (Post. en L), y los músculos vastos incluyendo *vastus intermedius* (VI en M) y *vastus lateralis* (VL en M). Observamos compromiso de *rectus femoris* y *gracillis* en pacientes en estadios avanzados (RF y Gra en N). Los músculos de piernas no se vieron comprometidos (O).

#### 4.4 Análisis transversal de RNM muscular en 3-point Dixon

Analizamos doce músculos de muslos y cuatro músculos de tronco. Las fig 24 y 25 resumen los resultados, evidenciando diferencias significativas en el infiltrado graso de los músculos entre pacientes sintomáticos y pacientes con hiperCKemia (Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ).



**Fig 24. Análisis del infiltrado graso en RNM muscular en muslos. Observamos diferencias significativas en el porcentaje de infiltrado graso cuantificado mediante secuencia 3-point Dixon en la mayoría de los músculos entre pacientes sintomáticos (barras rojas) y asintomáticos (barras verdes). Comparamos ambos grupos usando test t de Student (asterisco simple para diferencias con  $p < 0.05$  y doble asterisco para diferencias con  $p < 0.01$ ). RF: *rectus femoris*; VL: *vastus lateralis*; VM: *vastus medialis*; VI: *vastus intermedius*; AM: *adductor major*; AL: *adductor longus*; BSH: *bíceps cabeza corta*; BLH: *biceps cabeza larga*; ST: *semitendinosus*; SM: *semimembranosus*; SA: *sartorius*; GR: *gracilis*.**

El reemplazo graso de la musculatura paraespinal (*multifidus*, *longissimus* e *iliocostalis*) fue muy alto en pacientes sintomáticos, alcanzando valores mayores al 80% en 19/27 pacientes sintomáticos, y fue detectable en pacientes asintomáticos con hiperCKemia (promedio fracción grasa del 22.26%). (Fig. 25)

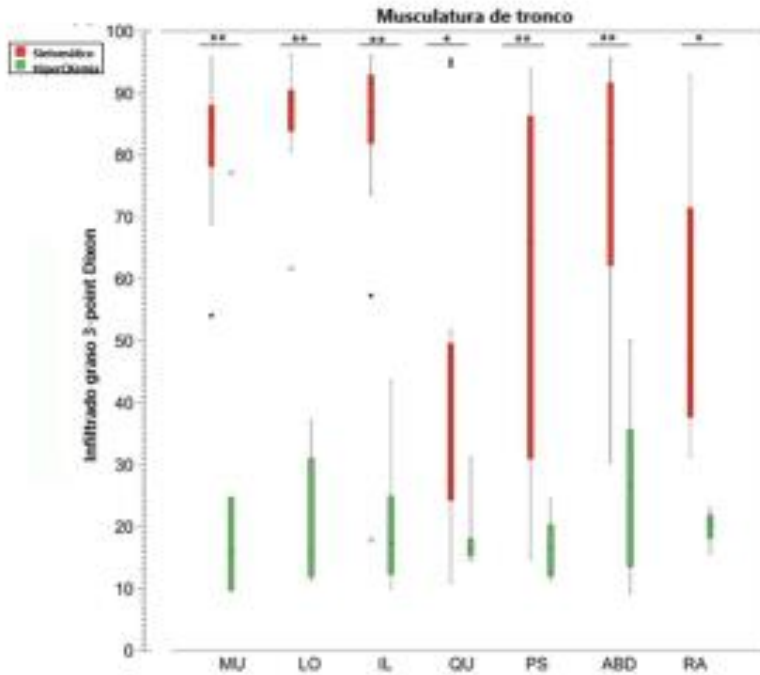


Fig 25. Análisis del infiltrado graso en RNM muscular en tronco. MU: *multifidus*; LO: *longissimus*; IL: *iliocostalis*; QU: *quadratus femoris*; PS: *psaos*; ABD: musculatura abdominal lateral; RA: *rectus abdominis*.

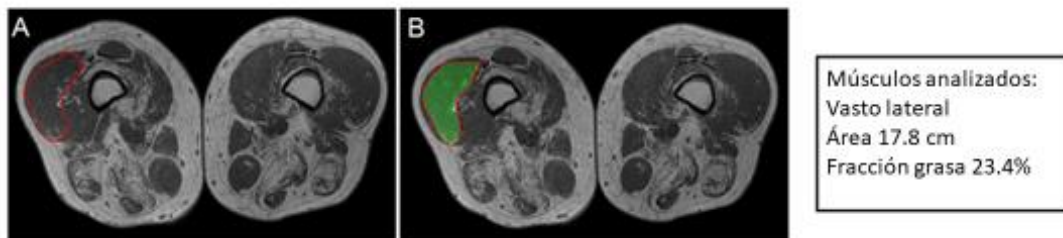


Fig. 26. Análisis basal de la fracción grasa de músculos de muslos y tronco en pacientes con EPA. A y B demuestran un ejemplo de cómo se dibujan las ROI (region de interés) para obtener un área muscular total y una fracción grasa.



#### **Muslo posterior**

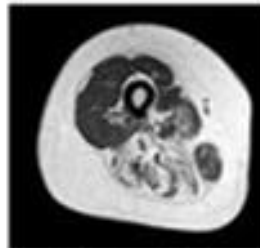
Pompe 14

Mercuri promedio: 0

Dixon promedio: 12.35

Flexión rodilla: 52.73

HiperCKemia, hombre 22 años



#### **Muslo posterior**

Pompe 1

Mercuri promedio: 2.25

Dixon promedio: 57.32

Flexión rodilla: 9.73

Sintomática, mujer 48 años

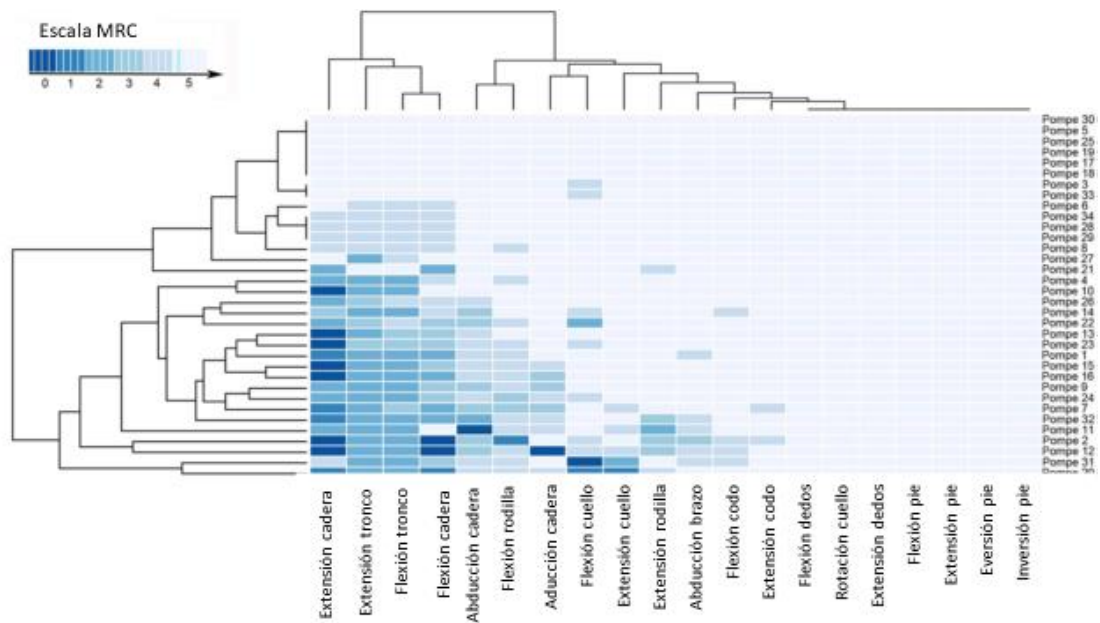
Fig. 27. Ejemplos de infiltrado graso de muslo derecho en un paciente con hiperCKemia y en paciente sintomático. Mostramos la cuantificación del infiltrado graso de la región posterior del muslo utilizando el score de Mercuri promedio y el 3 point Dixon promedio (*Semitendinosus*, *Semimembranosus*, *cabeza larga y cabeza corta del bíceps femoral*). Observamos un infiltrado graso predominantemente en región posterior de muslo produciendo disminución de fuerza en la flexión de la rodilla.

#### 4.5 Correlación de RNM muscular cualitativa, cuantitativa y pruebas de función motora

##### 4.5.1 Análisis de función muscular

La escala MRC detectó debilidad muscular en todos los pacientes sintomáticos. Un análisis jerárquico de los scores de la escala MRC determinó que la musculatura paraespinal, abdominal, y proximal a nivel de extremidades inferiores se correspondía con los grupos musculares más débiles (Fig. 28).





**Figura 28. Distribución de la debilidad muscular en los pacientes de la cohorte de EPA participantes en este estudio. El gráfico demuestra los valores de MRC para todos los músculos estudiados. La extensión y flexión de cadera, así como la extensión y flexión de tronco, fueron los movimientos más comprometidos en nuestros pacientes. En contraste, no observamos debilidad distal que comprometa miembros superiores.**

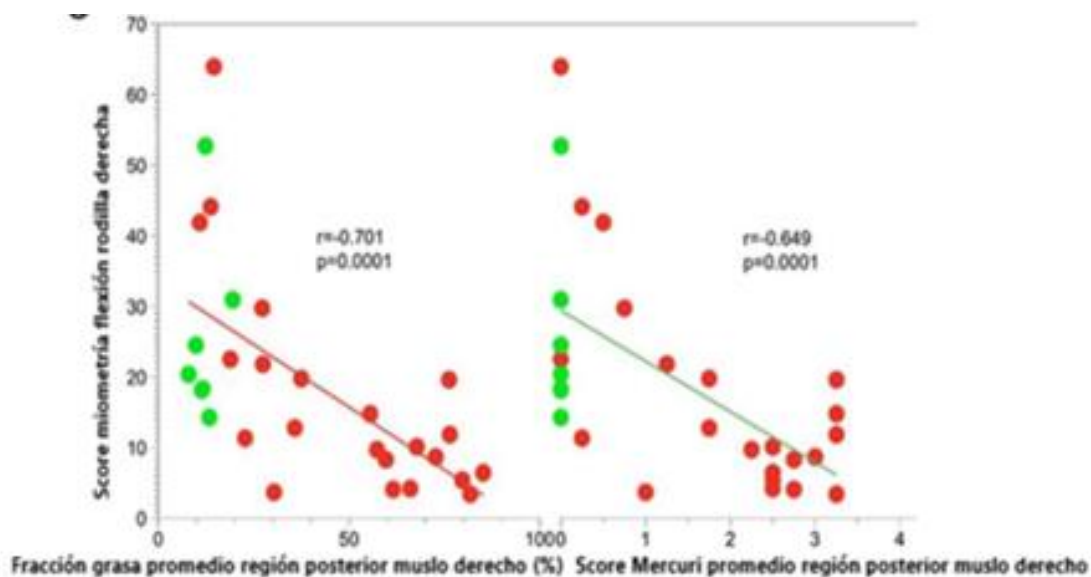
En general, la extensión de cadera fue más débil que la flexión de cadera, mientras que la aducción fue más débil que la abducción de muslos. El valor de escala MRC promedio fue de 161.5 puntos (rango 124–180). El score MRC tuvo una correlación significativa, si bien de bajo valor ( $r$  menor a 0.5) con la edad al momento del estudio (Spearman test,  $p:0.015$ ;  $r=-0.414$ ), con el tiempo desde el comienzo de los síntomas (Spearman test,  $p:0.018$ ;  $r = -0.404$ ) y con el género femenino (Spearman test,  $p = 0.009$ ,  $r: 0.441$ ) y no se correlacionó con el retardo en el inicio del TRE (Tabla 8) En contraste, el score MRC tiene una buena correlación con la mayoría de los test de función muscular utilizados en ensayos clínicos como el 6MWT o el tiempo para subir y bajar 4 escaleras, así como con escalas de actividades de la vida diaria (Activlim) o de función muscular (MFM-20) La correlación entre el score MRC y las escalas de calidad de vida fueron estadísticamente significativas, pero el coeficiente de correlación fue inferior a 0.5 (Spearman test,  $p:0.03$ ;  $r= 0.455$ ). También medimos la fuerza usando miometría digital. El score promedio de miometría fue de 196.3 puntos (rango 55 - 570) Hubo una buena correlación entre el score total de MRC y el score de miometría. (Spearman test,  $p = 0.001$ ;  $r: 0.667$ ). El score de miometría digital se correlacionó correctamente con los test de función muscular, pero esta correlación fue menor que la obtenida con el score MRC (Tabla 8).

Tabla 8 - Correlación entre score MRC, score de miometría, datos demográficos y test de función muscular

	Score de MRC		Score de miometría	
	Spearman test	Coefficiente de correlación	Spearman test	Coefficiente de correlación
Datos demográficos				
Género	0.009	0.441	0.01	0.553
Edad al momento del estudio	0.015	-0.414	0.049	-0.351
Tiempo desde el inicio de los síntomas	0.018	-0.404	0.012	-0.437
Demora desde el inicio del ERT	0.158		0.384	
Tests funcionales				
10 MWT	0.0001	0.803	0.0001	0.722
6MWT	0.0001	0.708	0.0001	0.642
Tiempo para levantar y andar	0.083	-0.322	0.487	-0.132
Tiempo para subir 4 escalones	0.0001	-0.810	0.0001	-0.630
Tiempo para bajar 4 escalones	0.0001	-0.770	0.0001	-0.664
MFM-20	0.0001	0.803	0.0001	0.722
Actividades de la vida diaria y escalas de calidad de vida				
Activlim	0.0001	0.860	0.0001	0.726
SF-36	0.017	0.448	0.002	0.579
Inquol	0.001	-0.587	0.001	-0.633
Tests respiratorios				
CVF sentado	0.012	0.454	0.469	0.140
CVF acostado	0.05	0.498	0.666	0.121
PIM	0.246	-0.308	0.254	-0.314
PEM	0.149	-0.392	0.670	0.125

#### 4.5.2 Correlación entre tests de función muscular y RNM muscular

La correlación entre las medidas de miometría y el infiltrado graso en músculos apropiadamente seleccionados fue similar entre 3-point Dixon y la secuencia T1w. Por ejemplo, la correlación entre la fuerza de flexión de rodilla y la fracción grasa promedio de la musculatura posterior del muslo (el promedio del infiltrado graso de la suma de *semimembranosus*, *semitendinosus*, cabeza larga y corta del *bíceps*) para 3-point Dixon fue  $\rho = -0.70$ , mientras que la secuencia de T1w, fue  $r = -0.649$  (Fig 29).



**Fig. 29.** Hubo una correlación positiva entre la fuerza de flexión de rodilla y el grado de infiltración grasa calculado mediante el 3-point Dixon (izquierda) y el score de Mercuri (derecha). Los puntos verdes demostraron los valores de los pacientes con hiperCKemia, mientras que las rojas representan los valores en pacientes sintomáticos

Desarrollamos un score de RNM en secuencia T1w que es la suma de la escala de Mercuri para cada músculo. El promedio del score de RNM fue 6 (rango: 0 a 15 puntos) en pacientes con hiperCKemia y 125.9 (rango: 39 a 210 puntos) en pacientes sintomáticos (Table 9).

Tabla 9 - Características radiológicas de pacientes con EPA sintomáticos y con hiperCKemia

	HyperCKemia (N=10)	Sintomáticos (n=24)	Significancia estadística
RNM muscular secuencia T1w			
Score RNM muscular total	6 (6.8)	125.9 (46.7)	<0.001
RNM muscular cabeza /brazos	2.1	25.3	<0.001
RNM muscular tronco	4.9	13.7	<0.001
RNM muscular piernas	0.5	74.3	<0.001
RNM muscular 3-point Dixon			
Fracción grasa muslos (%)	11.73	38.17	<0.0001
Fracción grasa musculatura paraespinal (%)	18.79	65.07	<0.0001

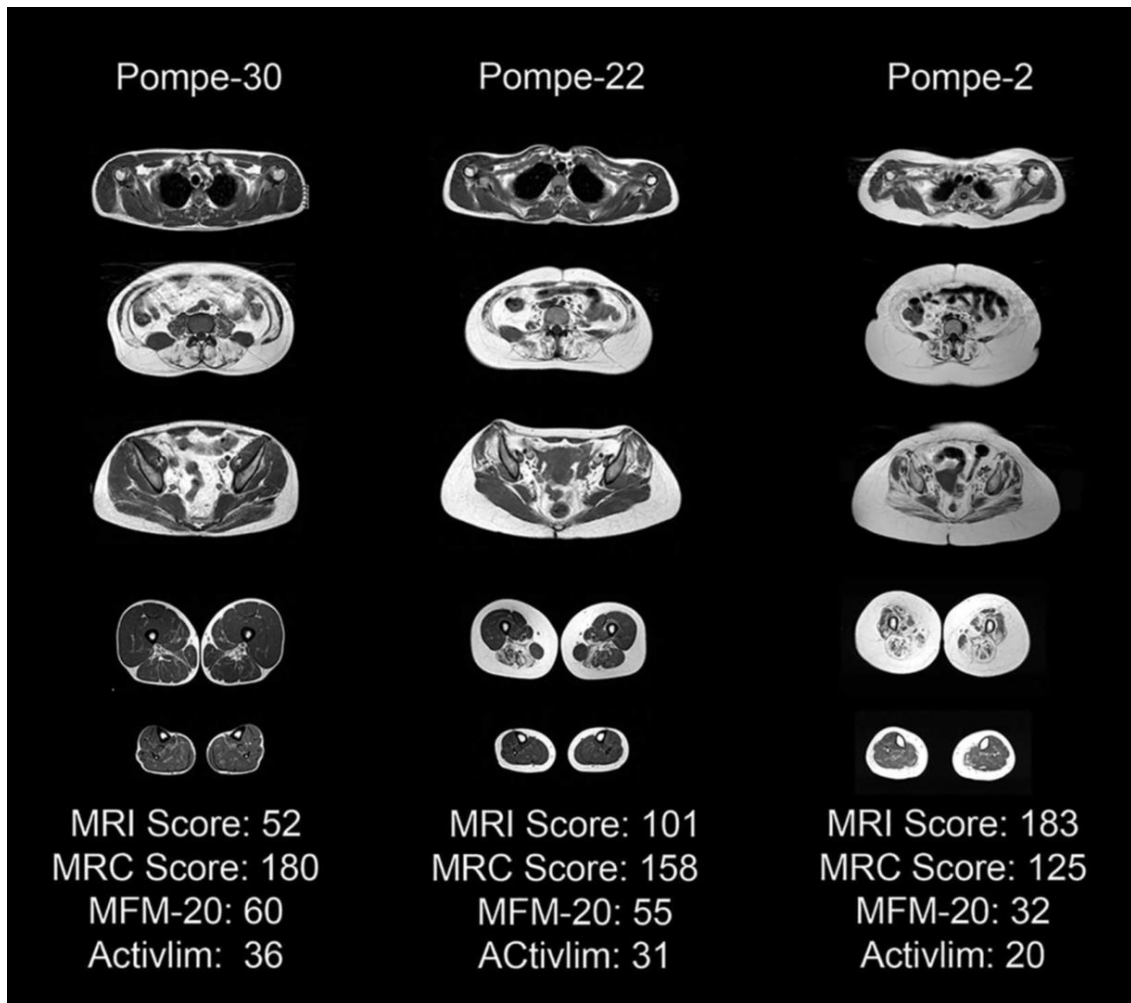
Estas diferencias alcanzaron significancia estadística (Mann-Whitney U,  $p < 0.001$ ). Encontramos una fuerte correlación entre el score de RNM en secuencia T1w, y la mayoría de los test de función muscular, como el score MRC, 6MWT, MFM-20 o la escala de Activim (Tabla 10).

**Tabla 10 Comparación entre correlación de Score de RNM y 3-point Dixon con datos demográficos y tests funcionales**

	T1w-MRI Score		3-point Dixon	
	Spearman Test	Coefficiente de correlación	Spearman Test	Coefficiente de correlación
<b>Datos demográficos</b>				
Género	0.069	-0.315	0.019	-0.456
Edad en RNM	0.055	0.381	0.022	0.391
Tiempo desde inicio síntomas	0.257	0.231	0.043	0.349
Retraso desde comienzo ERT	0.421	-0.224	0.498	-0.152
<b>Tests funcionales</b>				
Score de miometría	0.001	-0.560	0.0001	-0.633
6MWT	0.001	-0.610	0.0001	-0.764
Tiempo de levantarse y pararse	0.097	0.308	0.006	0.515
Tiempo para subir 4 escalones	0.0001	-0.782	0.0001	0.858
Tiempo para bajar 4 escalones	0.0001	-0.737	0.0001	0.810
MFM-20	0.0001	0.693	0.0001	-0.681
<b>Actividades de la vida diaria y escalas de calidad de vida</b>				
Activim	0.0001	0.785	0.0001	-0.754
<b>Tests respiratorio</b>				
CVF sentada	0.035	-0.386	0.018	-0.469
CVF acostado	0.08	-0.450	0.055	-0.544
PIM	0.356	0.247	0.40	0.253
PEM	0.541	-0.171	0.6	-0.16

Al contrario, no se encontró una buena correlación con los resultados de los test respiratorios o escalas de calidad de vida (SF-36 e INQoL).

También encontramos una fuerte correlación entre la fracción grasa de muslos medido mediante la secuencia 3-point Dixon y las escalas funcionales (Tabla 10). En la mayoría de los casos, los coeficientes de correlación fueron mayores para la secuencia 3-point Dixon que para la secuencia T1w. Por caso, el coeficiente de correlación entre 6MWT y 3-point Dixon fue  $\rho = -0.764$  mientras que fue más bajo para la secuencia T1w,  $r = -0.610$ . No hubo correlación entre la secuencia 3-point Dixon y los resultados de los estudios respiratorios.



**Fig 30. Correlación entre RNM muscular y escalas funcionales. El paciente 30 es un hombre de 43 años con un infiltrado graso leve de musculatura pélvica y de extremidades inferiores con poco impacto funcional. El paciente 22 es una mujer de 40 años con un infiltrado moderado en tronco, pelvis y muslos. Era capaz de efectuar la mayor parte de las actividades de la vida diaria, pero su exploración clínica evidenció debilidad moderada de musculatura pélvica. El paciente 2 es una mujer de 48 años con un compromiso muscular severo produciendo debilidad y afectando las actividades de la vida diaria.**

Fig 30 demuestra 3 ejemplos de correlación entre RNM muscular y tests funcionales.

Analizamos el grupo de pacientes con hiperCKemia en detalle. Encontramos cambios leves en la RNM muscular de cuatro de siete pacientes usando la secuencia T1w, los cuales fueron estadísticamente significativos (Mann-Whitney U test,  $p = 0.008$ ). Los pacientes con hiperCKemia que tenían cambios en la RNM muscular eran mayores de 20 años, mientras que no había cambios en los pacientes menores de 15 años. La secuencia 3-point Dixon demostró diferencias estadísticamente significativas en el grado de infiltrado muscular en la musculatura paraespinal en pacientes con

hiperCKemia mayores de 20 años cuando se lo comparó con pacientes menores de 15 años. (Tabla 11). Al contrario, las escalas funcionales fueron similares en ambos grupos.

Tabla 11 - Comparación entre pacientes presintomáticos con hiperCKemia dependiendo del resultado de la RNM

	RNM normal (n=3))	RNM anormal (n=4))	T test
Edad (años)	11	29.2	0.073
MRC Score	180	179.2	0.243
Score de miometría (Nm)	261.24	308.49	0.695
6MWT (min)	616	577	0.572
Tiempo para caminar 10 m (seg)	3.0	3.3	0.571
Tiempo para subir 4 escalones (seg)	1.4	1.5	0.677
Tiempo para bajar 4 escalones (seg)	1.3	1.5	0.455
Tiempo para levantarse y pararse (sec)	4.8	3.1	0.204
MFM-20	57.6	59.2	0.471
Activlim	36	36	1
Score RNM	0	10.5	0.008
Fracción grasa por 3 point Dixon en muslos (%)	11.93	11.58	0.865
Fracción grasa por 3 point Dixon en musculature paraespinal(%)	13.54	33.43	0.039

Hubo una fuerte correlación entre el score de Mercuri detectado mediante la secuencia T1w y la fracción grasa mediante secuencia 3-point Dixon (Fig 31)

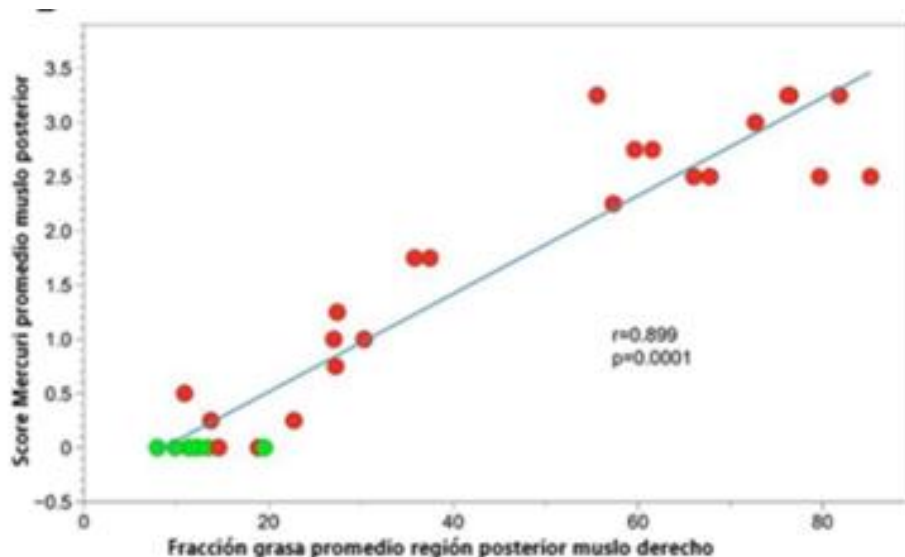


Fig. 31. Encontramos una fuerte correlación entre el 3 point Dixon y el score de Mercuri (*Semitendinosus*, *Semimembranosus*, *cabeza larga y corta del bíceps femoral*).

## 6 Cambios en pruebas funcionales y RNM muscular en un año de seguimiento

Repetimos los test de función muscular, espirometría, escalas de calidad de vida y RNM muscular al año en todos los pacientes. En el caso de pacientes sintomáticos, los test de función muscular, la espirometría, y las escalas de calidad de vida no demostraron cambios significativos desde el análisis basal al año 1 (Tabla 12).

Tabla 12. Cambio entre evaluación basal y al año entre test de función muscular, espirometría, RNM muscular cuantitativa y escalas de calidad de vida en pacientes sintomáticos y asintomáticos con EPA.

	<b>Pacientes sintomáticos tratados (basal vs. seguimiento a los 12 meses) (n=22)</b>	<b>P</b>	<b>Pacientes asintomáticos (basal vs. seguimiento a los 12 meses) (n=10)</b>	<b>P</b>
Test de función muscular				
<b>Score MRC total</b>	0 (-4-6)	0.79	0 (0-1)	0.31
<b>Score MRC extremidades inferiores</b>	0 (-5-4)	0.54	0 (0)	0.31

<b>Extensión rodilla (Nm)</b>	10.74 (0-20.44)	0.19	-0.96 (-18.11-3.15)	0.40
<b>Flexión rodilla (Nm)</b>	1.84 (-1.26-5.97)	0.20	-0.51 (-10.13-6.43)	0.67
<b>Flexión cadera (Nm)</b>	3.97 (-1.7-9.84)	0.14	-0.75 (-15.1-3.9)	0.40
<b>Extensión cadera (Nm)</b>	2 (-0.13-5.47)	0.08	-4.15 (-16.04-1.82)	0.40
<b>6-MWT, m</b>	0 (-9.5-11)	0.96	10 (-24.7-37.5)	0.48
<b>Tiempo para caminar 10 m, seg</b>	0 (-1.44-0.4)	0.43	-0.1 (-2.52-0.32)	0.91
<b>Tiempo para subir 4 escalones, seg</b>	0 (-0.42-0.5)	0.77	-0.1 (-0.32-0)	0.39
<b>Tiempo para bajar 4 escalones, seg</b>	0 (-0.35-1.32)	0.43	-0.05 (-0.12-0.1)	0.55
<b>Tiempo para levantarse y pararse, seg</b>	0.6 (-0.4-5.2)	0.47	-0.15 (-0.72-0.97)	0.94
<b>MFM-20, score</b>	0 (-2-2)	0.63	0 (0-1)	0.33
Estudios respiratorios				
<b>CVF sentado (%)</b>	-0.3 (-4-3)	0.24	0 (-6-5.77)	0.73
<b>CVF acostado (%)</b>	0 (-6.2-7.62)	0.73	9 (-2-12)	0.13
RNM muslo				
<b>RNM muslo, 3-point Dixon</b>	1.79 (0.2-2.4)	<b>0.001</b>	-0.11 (-0.82-0.4)	0.57
<b>RNM paraespinal, 3-point Dixon</b>	-0.03 (-2.23-0.73)	0.34	0 (-1.25-1.89)	0.77
Escala de calidad de vida				
<b>Activlim</b>	33 (1-59)	0.81	67.5 (37.5-70.2)	0.31
<b>SF36</b>	1.8 (-0.67-10.73)	0.22	3.28 (-24.84-10.12)	0.89
<b>INQoL</b>	-2.9 (-5.5-0.73)	0.17	-4.3 (-8.2-1.1)	0.31



Se demuestran media y percentiles 25-75<sup>to</sup>. El test de Wilcoxon apareado se usó para determinar si la presencia de diferencias observadas fueron significativas entre el análisis basal al año de seguimiento. P se consideró significativa si el valor fue menor a 0.05.

En contraste, las imágenes en 3-point Dixon detectaron un aumento promedio del 1.7% en la fracción grasa de muslo, lo que fue estadísticamente significativo (test de Wilcoxon apareado,  $p=0.001$ ) (Fig. 32)

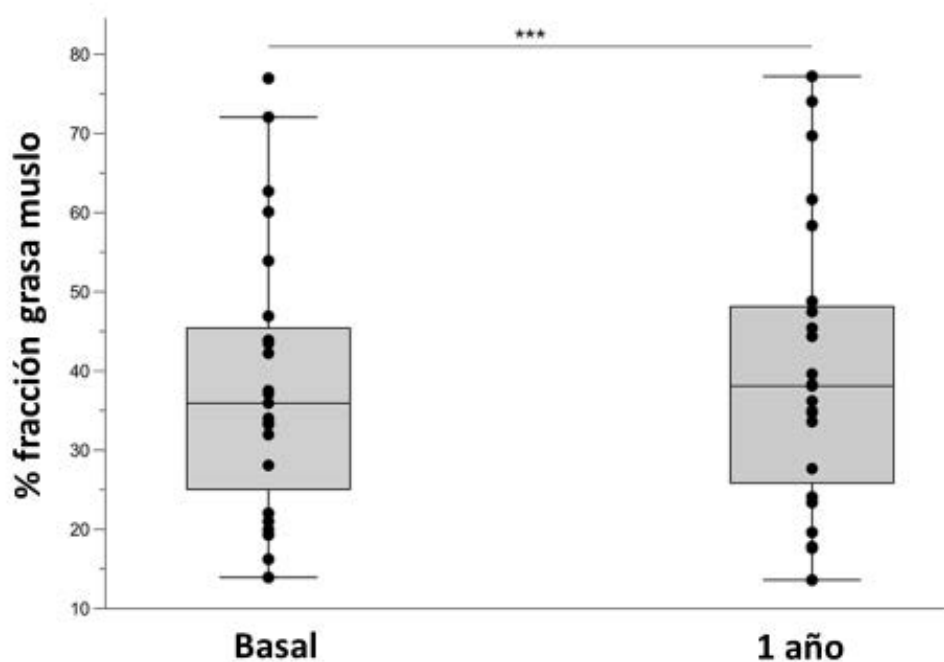


Fig. 32. Progresión anual del reemplazo graso muscular en muslo en pacientes sintomáticos con EPA. El diagrama de cajas incluye los percentiles 25<sup>to</sup>-75<sup>to</sup>, la línea media indica la media, las barras están entre los percentiles 5<sup>to</sup>-95<sup>vo</sup> percentiles. Cada punto representa un paciente con EPA. Test de U de Mann-Whitney \*\*\* $P<0.001$

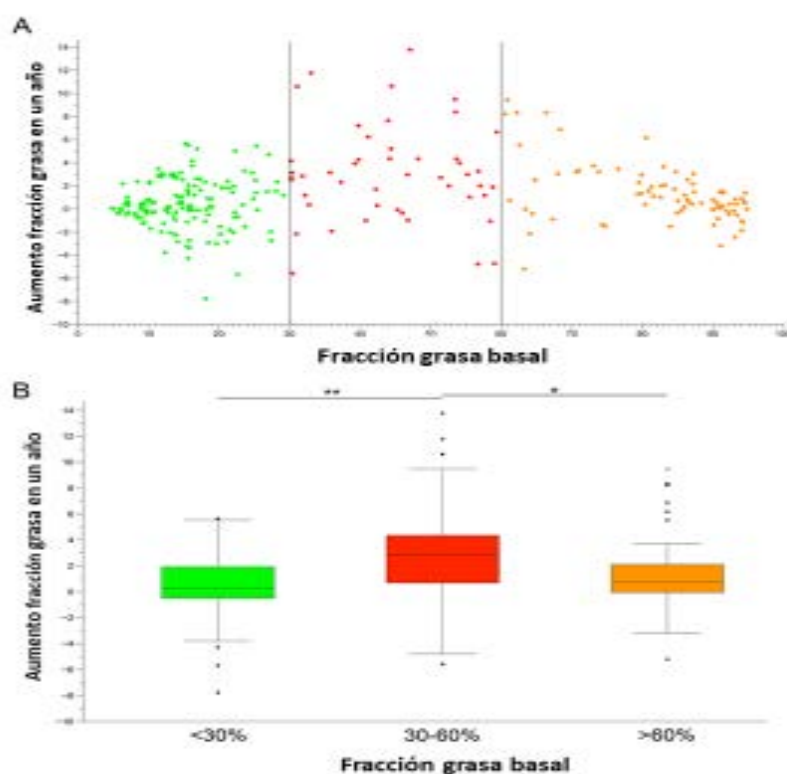
Los cambios de la fracción grasa entre el análisis basal y al año para cada músculo individualizado se detalla en la tabla 13.

Tabla 13. Progresión del reemplazo graso para cada músculo de muslo y tronco después de un año de seguimiento para cada grupo de pacientes: sintomáticos y asintomáticos.

	<b>Pacientes sintomáticos tratados (basal vs. 12 meses)</b>	<b>P</b>	<b>Pacientes asintomáticos (basal vs. 12 meses)</b>	<b>P</b>
<i>Recto femoral</i>	0.44 (0.02-2.22)	<b>0.04</b>	-1.04 (-1.94-0.19)	0.13
<i>Vasto lateral</i>	1.4 (0.01-2.99)	<b>0.009</b>	-0.55 (-1.3-0.22)	0.24
<i>Vasto medial</i>	0.22 (-1.04-2.8)	0.15	0.48 (-1.34-2.03)	0.44
<i>Vasto intermedio</i>	1.66 (0.24-3.21)	<b>0.001</b>	-0.54 (-1-0.05)	0.13
<i>Biceps femoral, cabeza corta</i>	1.76 (-0.3-2.78)	<b>0.007</b>	0.01 (-1.23-2.64)	0.64
<i>Biceps femoral, cabeza larga</i>	1.2 (-0.2-3.3)	<b>0.006</b>	0.36 (-0.79-0.64)	0.64
<i>Aductor largo</i>	0.04 (-1.6-1.24)	0.93	-0.2 (-1.62-1.35)	0.50
<i>Aductor magno</i>	0.51 (-0.06-1.66)	0.053	0.3 (-1.79-1.03)	0.57
<i>Sartorio</i>	1.03 (-0.85-2.34)	<b>0.08</b>	-0.97 (-1.38-1.13)	0.38
<i>Gracillis</i>	-0.11 (-2.44-1.79)	0.73	-0.71 (-1.79-0.77)	0.44
<i>Semitendinoso</i>	1.17 (0-3.22)	<b>0.02</b>	-0.45 (-1.9-0.77)	0.59
<i>Semimembranoso</i>	0.6 (-0.61-3.15)	0.10	1.82 (-0.16-3.21)	<b>0.02</b>
<b>Total muslo</b>	1.79 (0.2-2.4)	<b>0.001</b>	-0.11 (-0.82-0.4)	0.57
<b>Paraespinal</b>	-0.03 (-2.23-0.73)	0.34	0 (-1.25-1.89)	0.77
<b>Psoas</b>	0.97 (0.06-2.95)	<b>0.02</b>	-0.91 (-3.08-2.71)	0.67

La media se demuestra con percentiles 25to-75<sup>o</sup> Test apareado de Wilcoxon fue usado para determinar la existencia de diferencias significativas entre entre análisis basal y al año. P se consideró significativa si era menor a 0.05.

Estudiamos si factores demográficos o clínicos como el sexo o la edad al comienzo de la TRE se asoció a un aumento de la fracción grasa en muslo al año de seguimiento. Sólo verificamos una correlación significativa entre la fracción grasa de muslo basal y el incremento de la fracción grasa al año (Spearman test  $p=0.024$ ;  $p=0.48$ ). La fracción grasa de muslo en un paciente individual es un valor promedio de la grasa presente en músculos con distintos grados de compromiso, desde formas leves a reemplazo graso completo. Se ha demostrado recientemente que el estado basal de los músculos podría influenciar la respuesta al tratamiento y, en consecuencia, influenciar el aumento del infiltrado graso. Por esta razón, en un análisis exploratorio post-hoc, decidimos estudiar todos los músculos individualmente, como variables separadas. Clasificamos los músculos como infiltrado leve si la fracción grasa era menor 30% en el análisis basal, infiltrado moderado si la fracción grasa basal se encontraba entre 30 a 60% e infiltrado severo si la fracción grasa basal era mayor al 60%. Había diferencias significativas en el incremento de grasa al año entre los tres grupos (Kruskal-Wallis,  $p<0.0001$ , Fig. 32).



**Fig.32. Progresión anual del reemplazo graso en músculos individuales de pacientes sintomáticos.** A: Cada punto representa la fracción grasa calculada en cada músculo individual. Las líneas verticales dividen los músculos acorde la fracción grasa basal: bajo (puntos verdes, 0-30%), intermedio (puntos rojos, 30-60%) y severo (puntos naranjas, 60-90%). B): Progresión del reemplazo graso en relación a la fracción grasa basal. El diagrama de cajas incluye los percentiles 25<sup>to</sup>-75<sup>to</sup>, la línea media indica la media, las barras corresponden a los percentiles 5<sup>to</sup>-95<sup>to</sup>. Los puntos negros son valores aislados. Kruskal-Wallis test, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

Observamos que aquellos músculos con menos del 30% de infiltrado graso en el estudio basal tienen menos incremento de la fracción grasa después de un año que los músculos que presentaban una fracción grasa entre 30 al 60% (media +0.28% vs +2.84%,  $p < 0.0001$ ). En una vía similar, aquellos músculos con más del 60% de infiltrado graso basal tienen menos incremento en la fracción grasa después de un año de seguimiento que aquellos músculos con fracción grasa de entre un 30 y 60% (media +0.75% vs +2.84%,  $p = 0.004$ ).

La fracción grasa muscular no cambió significativamente en los pacientes asintomáticos. El cambio promedio de la fracción grasa de muslo en este grupo de pacientes fue -0.11% (Test apareado de Wilcoxon,  $P = 0.57$ ). Sin embargo, el análisis detallado de cada músculo individual demostró un incremento significativo del infiltrado graso del músculo semimebrano (+1.82%, test apareado de Wilcoxon,  $P = 0.02$ ) (Tabla 13). No encontramos cambios significativos en los test de función muscular en este grupo de pacientes después de un año de seguimiento (Tabla 12).

# DISCUSIÓN

## 5. DISCUSIÓN

La enfermedad de Pompe del adulto es una enfermedad de herencia autosómica recesiva, rara, caracterizada por el depósito de glucógeno en los lisosomas, con compromiso multisistémico, que deriva en un cuadro de debilidad muscular progresiva y falla respiratoria precoz. Su desarrollo lentamente progresivo la ha asociado a una importante morbi-mortalidad precoz. El inicio temprano de la terapia de reemplazo enzimática (TRE) es necesaria para obtener el máximo beneficio terapéutico, lo que obliga a efectuar un diagnóstico precoz. Antes del año 2010, el tratamiento de los pacientes con enfermedad de Pompe del adulto se basaba principalmente en una terapia paliativa. El desarrollo de la TRE ha modificado curso de la enfermedad, asociándose a una estabilización de la progresión de los síntomas.

Esta tesis doctoral permite confirmar la utilidad de la RNM cuantitativa para el seguimiento de pacientes con enfermedad de Pompe del adulto, evidenciándose un aumento del infiltrado graso a nivel de muslo en un período de un año. La RNM cuantitativa podría adquirir un rol fundamental en el seguimiento de pacientes con EPA, tanto para ver el grado de evolución de pacientes en una enfermedad de naturaleza muy heterogénea, como en el análisis de nuevos tratamientos. A su vez, también logramos evidenciar que tanto la RNM muscular cuali- como cuantitativa, se correlacionan positivamente con los test de función muscular. Finalmente, hemos logrado verificar un deterioro de las habilidades motoras en pacientes tratados más de cinco años con TRE.

Tanto en EPA como en otras enfermedades neuromusculares, es indispensable el desarrollo de nuevos biomarcadores para definir la eficacia de los tratamientos. En ese punto, es cada vez más importante el rol asignado a la RNM muscular cuantitativa como biomarcador, ya que permitiría definir progresión de la enfermedad en cortos períodos de tiempo, sobre todo cuando planteamos enfermedades de muy lenta evolución. En un primer tiempo, esta tesis buscó definir la correlación entre la RNM cuantitativa y cualitativa con las pruebas funcionales. Una vez definida esta correlación, en un segundo tiempo, buscamos determinar el grado de progresión de la EPA en pacientes afectos acorde RNM cuantitativas.

Hemos logrado demostrar que la RNM muscular es una herramienta muy útil para el estudio de pacientes con EPA por varias razones. Por una parte, esta tecnología permite identificar grupos musculares comprometidos, los que se corresponden con los músculos más débiles en la exploración clínica. La RNM muscular tiene una buena correlación con las escalas funcionales musculares usadas en ensayos clínicos. Además, tiene una alta sensibilidad para detectar infiltrado graso tempranamente en

pacientes con hiperCKemia, antes que las escalas funcionales se vean afectadas. Basado en estos resultados, podemos afirmar que la RNM muscular es una efectiva herramienta para investigar la función muscular en pacientes con EPA.

La RNM muscular está adquiriendo un rol cada vez más relevante en el estudio de las enfermedades musculares (146). Hay secuencias disponibles para analizar distintas características de la estructura muscular. Carlier et al demostraron la gran utilidad de la secuencia T1w WBMRI en un grupo de 20 pacientes con EPA, en la que se determinó la presencia de señal hiperintensa en ciertos músculos específicos (100), facilitando el reconocimiento del patrón cuando el diagnóstico no está claro (147). Sin embargo, la cuantificación del infiltrado graso mediante secuencia T1w utilizando escalas semicuantitativas (como es el caso del T1W) es extremadamente observador – dependiente y poco fidedigno. En cambio, el análisis mediante la secuencia cuantitativa 3-point Dixon, utilizando softwares altamente especializados, permiten cuantificar exactamente la carga de grasa por pixel. Por lo tanto, esta secuencia es más precisa que la secuencia T1w para detectar cambios sutiles en el infiltrado graso. Es esta la razón por la que la secuencia 3-point Dixon podría ser utilizada en ensayos clínicos en pacientes con EPA, en la que el infiltrado graso se establece lentamente en el tiempo.

También podemos afirmar que la RNM muscular es un potente biomarcador de función muscular en pacientes con EPA. La RNM no sólo es útil para el diagnóstico, sino que también logra predecir función muscular en estos pacientes. Inclusive, permite visualizar infiltrado muscular graso antes que los test funcionales se alteren en pacientes asintomáticos con EPA, lo cual podría ayudar a determinar cuándo iniciar la TRE. Basado en nuestras observaciones, creemos que la RNM muscular podría ser usada como un test complementario o biomarcador en ensayos clínicos y en la práctica diaria de pacientes con EPA.

Esta tesis demuestra que la RNM cuantitativa usando 3 point Dixon es una herramienta muy útil para monitorizar la evolución anual de pacientes con EPA. La RNM cuantitativa se demostró como más sensible a los cambios en un período de un año que los otros tests musculares convencionales utilizados. Analizamos una gran cohorte de pacientes con EPA, estudiando tanto pacientes sintomáticos tratados como asintomáticos con hiperCKemia aislada. Estos resultados apoyan e incorporan a la RNM cuantitativa al protocolo a utilizar en el seguimiento de pacientes con EPA. En el caso de pacientes bajo tratamiento, la RNM cuantitativa podría ser útil para analizar su respuesta. En caso de pacientes asintomáticos, el incremento del infiltrado graso detectado en la RNM

cuantitativa debería ser tenido en cuenta al momento de decidir iniciar la TRE, así como también podría ser útil para el seguimiento de los pacientes.

Las miopatías hereditarias se caracterizan por una progresión muy lenta con el paso de los años. El tejido muscular es reemplazado por tejido graso y fibrótico, lo cual lleva al desarrollo de debilidad muscular(148). Sin embargo, los cambios anuales en la fuerza muscular y la función pueden ser sutiles y dificultar la cuantificación. Más aún, no es infrecuente encontrar una tasa heterogénea de progresión entre los pacientes. Por esta razón, establecer la tasa de progresión de estas miopatías hereditarias con el paso de los años es una tarea complicada. Es necesario enfrentar este problema, especialmente en la actualidad, cuando un gran número de nuevos medicamentos se están testeando en ensayos clínicos, los cuales se espera que enlentezcan el deterioro observado en estas enfermedades (149). Al frente de estos avances científicos, el campo neuromuscular necesita biomarcadores que permitan detectar cambios leves en la estructura muscular y la función (150–152). Es por este motivo que la RNM cuantitativa ha sido insistentemente testada como una herramienta para el seguimiento de pacientes con diversas enfermedades neuromusculares (92,102,124,153).

Nuestro estudio incorpora nueva información sobre la evolución natural de la progresión de EPA. En Pompe, el cambio patológico más precoz es la acumulación de glucógeno dentro de los lisosomas (27). Esta acumulación progresiva en los lisosomas acarrea dos consecuencias. Por un lado, hay una disfunción de las propiedades contráctiles de las miofibrillas; por otra parte, el proceso de autofagia termina afectando la acumulación de detritus dentro de las fibras musculares(31)(154). Eventualmente cualquier fibra muscular se puede degenerar y ser reemplazada por grasa, lo cual se puede detectar en la RNM muscular. La TRE ha demostrado reducir la acumulación de glucógeno en el sarcoplasma, reactivando la autofagia celular y reduciendo la pérdida de fibras musculares (40). Por lo tanto, 3-point Dixon puede ser utilizada para el seguimiento de la progresión de la pérdida de masa muscular y para el reemplazo graso en EPA, lo cual es la consecuencia de la acumulación de glucógeno en los lisosomas. Sin embargo, la secuencia 3-point Dixon no identifica glucógeno, lo cual podría ser muy útil para el seguimiento de pacientes asintomáticos en quienes la necrosis muscular apenas ha empezado o es mínima (126). Las secuencias para detectar glucógeno en tejido muscular incluyen la (13)C-MR espectroscopía, imágenes de transferencia de saturación de intercambio químico o MRS protónica. Sin embargo, esta tecnología no está disponible en la práctica habitual (127). Las secuencias de RNM utilizadas habitualmente en la práctica clínica incluyen las secuencia T1, T2 y STIR (155). Se ha descrito recientemente un aumento de la señal de STIR en músculos de pacientes con



EPA, lo que se ha sugerido que se corresponda con la presencia de moléculas de agua retenidas por el glucógeno (134). Este incremento no se detectó en todos los pacientes con enfermedad de Pompe. De la misma forma, también se detectaron incrementos de la señal T2 en algunos pacientes con EPA (125). A pesar que este aumento de la señal STIR se ha relacionado a la acumulación de agua o edema, el aumento de la señal T2 es inespecífico y puede ser observado en necrosis muscular, inflamación o presencia de agua libre (156,157). Por lo tanto, todavía necesitamos secuencias de RNM capaces de identificar glucógeno para ser utilizadas en la práctica clínica, requiriéndose más investigación en esta área.

En lo que respecta a la evolución clínica de los pacientes, nuestro estudio analizó una cohorte transversal de pacientes con EPA, lo que permite comparar el impacto de la TRE sobre el estado funcional de los pacientes en dos grupos: pacientes tratados menos de cinco años y más de cinco años. La TRE impresiona estabilizar la función motora durante los primeros años de tratamiento, si bien nuestros datos apuntan a un deterioro de estas capacidades a posteriori. Nuestros resultados acuerdan con datos recientes de dos grandes series de pacientes tratados por más de cinco años, y probablemente reflejan que se mantiene la destrucción de fibras musculares a pesar del tratamiento instaurado (82) (158)

#### 6.1 Utilidad de la RNM cuantitativa como biomarcador evolutivo de pacientes con enfermedad de Pompe del adulto

En esta tesis, analizamos la progresión del infiltrado graso en pacientes con EPA durante un período de un año usando la secuencia 3-point Dixon. Nuestros resultados convalidan previas observaciones sobre utilidad y reproducibilidad de esta técnica. Logramos demostrar que el análisis repetido en forma anual de las imágenes tiene una mayor capacidad que los test de función muscular para detectar cambios leves en un corto período de tiempo. Sin embargo, en nuestra opinión, el 3 point-Dixon tiene limitaciones. El análisis de las imágenes aún se efectúa en forma manual, ya que hay que dibujar las ROI sobre cada músculo, haciendo que la evaluación de las imágenes sea muy lenta, y con requerimiento de un alto grado de experiencia y paciencia. Los softwares que pueden detectar automáticamente la fracción grasa en un determinado corte están disponibles, pero no se han aplicado al campo de las enfermedades neuromusculares aún (160). Como la infiltración grasa no es homogénea en los músculos, numerosos cortes deben ser analizados para tener una idea del reemplazo graso promedio. Inclusive, el análisis de un nuevo set de imágenes de un

determinado paciente después de un período de tiempo requiere definir un marco anatómico protocolizado para reconocer los cortes que han sido previamente cuantificados.

Este es el estudio prospectivo más grande usando RNM cuantitativa en EPA. Analizamos 22 pacientes tratados con TRE, incluyendo una amplia variedad de situaciones clínicas, desde pacientes en sillas de ruedas requiriendo ventilación hasta otros con debilidad muscular leve, sin mayor interferencia en las actividades de la vida diaria (161,162). Dos reportes incluyendo estudios longitudinales de RNM cuantitativa han sido reportados previamente. Carlier et al efectuaron un análisis retrospectivo de 14 pacientes con EPA tratados y evidenciaron un crecimiento significativo del 0.9% del infiltrado graso en los músculos de las extremidades inferiores en un período de un año (125). El estudio EMBASSY ofreció datos sobre el seguimiento de 16 pacientes con EPA usando tests de función muscular o biopsias musculares repetidas (140). Cinco de los 16 pacientes fueron seguidos con RNM cuantitativa usando la secuencia 3-point Dixon. Después de seis meses, un incremento promedio del 0.6% en la fracción grasa de todos los músculos se observó en las extremidades inferiores, lo cual no fue significativo. Sin embargo, ambos estudios analizaron también músculos de las piernas, como el tibial anterior o sóleo, los cuales habitualmente se comprometen muy poco en EPA, lo cual seguramente reduce el incremento final observado en el aumento de la fracción grasa (71).

Esta tesis demuestra un incremento promedio del 1.7% de la fracción grasa en pacientes sintomáticos bajo TRE después de un año de seguimiento. Al contrario, no se detectaron cambios funcionales en el mismo período de tiempo. Este incremento en la fracción grasa probablemente no sea suficiente para generar cambios funcionales en ese período de tiempo. Sin embargo, el incremento progresivo de la fracción grasa puede resultar en deterioro de la función muscular en pacientes bajo TRE por más de 5 años (82). Sería muy interesante conocer el porcentaje de incremento del infiltrado graso en pacientes sintomáticos no tratados en EPA. Una de las limitaciones de este estudio es la ausencia de un grupo control que incluya estos pacientes, lo cual se debe a que la TRE se empieza rápidamente, apenas los pacientes desarrollan debilidad muscular.

Los factores que influyen la respuesta a la TRE en EPA todavía no se conocen. La mayoría de los músculos presentan un lento deterioro progresivo a pesar del tratamiento, semejante a lo que ocurre en muchas distrofias musculares lentamente progresivas. Observamos que aquellos músculos que presentan menos infiltrado en la RNM basal son los que menos progresan. Este hallazgo ha sido descrito por otros

grupos en enfermedad de Pompe y podría estar relacionado con que los músculos con un cierto grado de degeneración, pueden presentar acúmulo de vacuolas autofágicas, lo cual altera el transporte de la enzima desde el sarcolema a los lisosomas, reduciendo el efecto de la droga (40,154,163). Inclusive, esta tasa de progresión también se ha observado en distrofia facioescapulo-humeral (124), lo cual sugiere que un determinado grado de daño muscular basal del músculo esquelético se asocia a una progresión más rápida de la enfermedad. Si esto se confirmase, el tratamiento temprano se podría asociar a un mejor y más duradero efecto de la droga, lo cual debería ser estudiado en el contexto de ensayos clínicos (40,137). Sin embargo, creemos que la RNM cuantitativa puede jugar un rol importante en la detección temprana del infiltrado graso muscular, lo cual implica un seguimiento más cercano de pacientes asintomáticos.

En los últimos años, diversos grupos han empezado a utilizar secuencias de RNM cuantitativa para efectuar seguimiento de pacientes con EPA. Sin embargo, esta técnica tiene algunos contratiempos: no está disponible en muchos centros médicos, necesita softwares específicos para la cuantificación y el análisis de las imágenes, y consume mucho tiempo. Para sortear estas limitaciones, algunos autores han cuantificado tejido graso mediante secuencias T1w. Por ejemplo, Pichiecchio et al siguieron 9 pacientes con EPA por seis meses, así como Gruhn et al analizaron la RNM muscular de 7 pacientes con EPA mediante esta secuencia (90) (137). A pesar de ser capaces de identificar cambios en el tejido graso muscular, se ha reportado en la literatura que la secuencia 3-point Dixon es más precisa que T1w para la evaluación de la fracción grasa en estudios longitudinales en enfermedades neuromusculares (115)

El análisis de musculatura paraespinal y abdominal es crucial para determinar cambios y definir si hay una progresión en el infiltrado graso (132) Alejaldre et al demostraron el compromiso temprano de la musculatura paraespinal en pacientes con EPA, el cual se puede presentar como miopatía axial pura (132) . En este sentido, la secuencia 3-point Dixon ha emergido como una potente herramienta, superior a la secuencia T1w, para detectar cambios leves en el porcentaje de infiltrado graso en músculo esquelético (115) . Otras secuencias cuantitativas, como T2-mapping, también demostraron un mejor perfil que la secuencia T1w para evidenciar cambios mínimos en la progresión de la enfermedad (125). Es cada vez más evidente la necesidad de reforzar nuestro conocimiento de las nuevas técnicas cuantitativas para poder analizar la progresión de la enfermedad.

Basado en nuestros resultados, concluimos que la RNM cuantitativa es útil para monitorizar pacientes con EPA sintomáticos y asintomáticos tratados o no tratados con

TRE y debería ser considerada como parte de los tests rutinarios efectuados a pacientes con EPA.

## 6.2 Características clínicas y genéticas de la cohorte

Esta tesis se corresponde con la mayor cohorte de pacientes con EPA estudiados en España, obteniéndose tanto características clínicas de los pacientes como genéticas. Respecto a este último punto, la mutación más frecuentemente aislada fue la c.-32-13T>G, en más de un 80% de los pacientes. Este elevado porcentaje habitualmente se observa en población europea caucásica. Esta mutación, habitualmente heterogénea desde un punto de vista clínico, no se correlacionó con característica clínica alguna. La edad promedio de inicio de los síntomas no difiere de los descritos en la bibliografía (8,46).

Es evidente la influencia de la TRE en la enfermedad, a partir de la comparación de diversas características clínicas de nuestros pacientes sintomáticos, casi todos tratados, respecto a los pacientes de los estudios de historia natural de la enfermedad, como los descritos por Hagemans et al (8), antes del descubrimiento de la TRE. No hubo diferencias en el número de pacientes que requirieron VNI en ambos grupos (37% en el grupo de Hagemans vs 40% en nuestra cohorte) ni en la edad a la que se empezó la ventilación. Sin embargo, parece importante referir que solo dos pacientes empezaron la VNI una vez iniciada la TRE en nuestra cohorte. Ninguno de nuestros pacientes estaba confinado a la silla de ruedas, a diferencia del 22% del estudio de Hagemans.

## 6.3 Descripción de los hallazgos de RNM muscular mediante secuencias T1W y 3-point Dixon en nuestra cohorte

Existe abundante bibliografía definiendo el compromiso muscular por imágenes en EPA, ya sea mediante RNM o TAC. Esta tesis confirma el deterioro precoz de la musculatura paraespinal y abdominal (132), así como de determinados músculos del muslo, como adductor magnus y semimembranoso. Posteriormente, se comprometen la cabeza larga del bíceps femoral, vasto intermedio y vasto medial, perdiéndose el resto de los músculos en estadios más avanzados (61,71).

Una de las más importantes incorporaciones que efectúa esta tesis al estudio de los patrones de compromiso muscular es la utilización de heatmaps(159,160). El análisis de la WBMRI puede ser dificultoso por la gran cantidad de datos. En ese sentido el heatmap es una técnica gráfica que provee de una representación visual de cada músculo de cada paciente, permitiendo tener una visión clara del contexto con gran

rapidez. Por ejemplo, ningún paciente de nuestra cohorte presentó compromiso de la musculatura de piernas, lo cual es fácilmente visualizable, y permite afirmar que un paciente con sospecha de EPA que tenga compromiso de musculatura de piernas, es poco probable que tenga EPA. Estas técnicas también facilitan los análisis de grandes series de pacientes. El heatmap destaca aquellos músculos que tienden a estar comprometidos de forma similar, lo cual es relevante para la interpretación clínica. Este resultado actúa como una “huella dactilar” de la enfermedad de base, y permitiría comparar distintas enfermedades entre sí.

#### 6.4 Correlación de la función muscular con RNM muscular cuali- y cuantitativa en EPA

Para considerar los resultados de la RNM muscular como biomarcador en un ensayo clínico, es indispensable correlacionarlo con los test de función muscular (123). Hemos demostrado una potente correlación entre los resultados de la RNM muscular y diversas escalas musculares que habitualmente se usan en ensayos clínicos, como la escala MRC, el tiempo para caminar 10 metros, o la escala Activlim. Detectamos una correlación significativa entre la fuerza muscular usando miometría digital y la fracción muscular grasa. Por lo tanto, la RNM muscular provee evidencia de daño muscular, el cual se relaciona tanto con la fuerza muscular como con diversos test funcionales, lo cual es independiente del esfuerzo del paciente. Este hecho es particularmente relevante en EPA, donde el 6MWT se ha utilizado históricamente como el test funcional principal para analizar la respuesta al tratamiento. El 6MWT no sólo depende de la fuerza muscular, sino que está influenciado por otros factores, como la disnea y el dolor muscular. De hecho, encontramos una buena correlación entre la RNM muscular y el 6MWT. Inclusive, la correlación entre RNM muscular y fuerza muscular fue potente. Los grupos musculares más comprometidos fueron también los más débiles en los test de fuerza mediante MRC. Los heatmaps analizando MRC (Fig 28) y RNM muscular (Figs 21 y 22), prácticamente se podían superponer. Basado en estos resultados, se puede afirmar que la RNM muscular ofrece una forma de medición válida y consistente de la función muscular. El grupo de Hovarth estudió 7 pacientes con EPA y 11 controles, usando secuencia PDFF WBMRI (136). Reportaron una gran sensibilidad de la RNM muscular para detectar cambios sutiles en la RNM en los músculos esqueléticos y una buena correlación entre estos resultados y la fuerza muscular mediante MRC. Esta tesis, que incluye un mayor número de pacientes, una exploración física más detallada, una

comparación entre secuencias de RNM cuali y cuantitativa, y un protocolo de RNM más corto (no más de 45 minutos), confirma estos resultados.

La RNM muscular permite identificar cambios tempranos en la señal muscular de muchos trastornos neuromusculares. Este trabajo demuestra la existencia de signos de infiltrado graso muscular en 4 de 7 pacientes sin signos clínicos de debilidad muscular. Tanto el examen clínico, como los test funcionales o respiratorios eran normales en estos pacientes. Por el contrario, la RNM muscular ya demostraba la existencia de cambios sutiles, sobre todo en musculatura paraespinal y abdominal, sugiriendo que el proceso de degeneración muscular ya había empezado. Un estudio retrospectivo de una pequeña cohorte de pacientes con EPA analizando la RNM muscular de cuatro pacientes asintomáticos, evidenció un notable incremento del infiltrado graso del músculo aductor magnus en todos ellos, así como cambios leves en los restantes músculos del muslo de un paciente pre-sintomático, sugiriendo que el infiltrado graso se inicia antes de la presencia de manifestaciones clínicas (100). Estos autores usaron sólo la secuencia T1w para determinar los valores medios de gris, lo cual no es una técnica cuantitativa. Nosotros usamos la secuencia 3-point Dixon para calcular el porcentaje exacto de grasa de cada músculo (105). Inclusive, analizamos la función muscular en detalle demostrando la ausencia de síntomas en los pacientes con hiperCKemia aislada, lo cual refuerza nuestros resultados. En nuestra opinión, la detección de un incremento progresivo de la cantidad de grasa de músculo esquelético de pacientes con EPA podría ser tenido en cuenta antes de iniciar la TRE en pacientes clínicamente asintomáticos. A pesar que no se conoce qué grado de infiltrado muscular es necesario en un músculo determinado para generar debilidad, parece evidente que el proceso de degeneración muscular no es reversible una vez que el tratamiento se ha iniciado (112,159). Basado en estos resultados, creemos necesario efectuar un seguimiento de los pacientes con EPA, especialmente aquellos con hiperCKemia aislada.

#### 6.5 Evolución clínica de paciente bajo terapia de reemplazo enzimático por períodos mayores a 5 años

La historia natural en pacientes con EPA no tratados no está suficientemente definida. Hay solo unas pocas publicaciones que analizan la progresión clínica de los pacientes a lo largo de los años (161–163). Sin embargo, en forma general, podemos afirmar que los pacientes empiezan a presentar debilidad muscular a los 30, la cual progresa en las dos décadas siguientes, llevando a un moderado a severo grado de discapacidad. A los 50 años, el 50% de los pacientes puede necesitar silla de ruedas para largas distancias.

El compromiso respiratorio, sin embargo, puede aparecer en cualquier momento, afectando la función motora y llevando a la utilización de ventilación no invasiva en la mayoría de pacientes después de los 60 (8,161). Es muy difícil saber en este momento cuál va a ser el impacto de la TRE en la historia natural de EPA. Es muy importante tener en cuenta que la mayoría de los pacientes han sido tratados por menos de 10 años. Sin embargo, parece evidente que la TRE estabiliza la función motora los primeros años y probablemente reduzca la progresión de la enfermedad. Estudios recientes avalan esta hipótesis, reflejando un cambio en las capacidades motoras en los pacientes bajo TRE en EPA(81,164,165). Por ejemplo, sólo dos pacientes (15%) de nuestra cohorte necesitaron silla de ruedas para cubrir largas distancias, siendo menor al 50% que se describen en estudios de historia natural en pacientes no tratados. Sin embargo, como muchos pacientes tratados por mayores períodos de tiempo tenían la impresión de presentar un empeoramiento, decidimos analizar esto en detalle. Observamos un deterioro leve de las capacidades motoras, especialmente a nivel de las piernas, en pacientes tratados más de cinco años. Estos datos se ven apoyados por nuestros hallazgos en RNM muscular cuantitativa después de un año de seguimiento. La heterogeneidad del deterioro es muy significativa, habiendo pacientes que no presentan ningún grado de deterioro motor o respiratorio después de muchos años de tratamiento. Los factores que podrían influir en la respuesta individual a la TRE no son conocidos, pero podrían guardar relación con la edad, genética, status clínico al inicio de la TRE y otros factores ambientales y de calidad como el ejercicio, la dieta o la exposición a tóxicos (24,137)

El declive de la función motora tiene una correspondencia con el daño histológico. Estudios efectuados en modelos animales preclínicos demostraron un aumento de las vesículas autofágicas en las fibras musculares de ratones GAA-/- tratados con TRE, lo cual podría ser una explicación posible (31). Sin embargo, reportes recientes analizando biopsias musculares en pacientes bajo tratamiento evidenciaron una disminución significativa de la tinción de PAS dentro de las fibras musculares, desaparición de las vacuolas, aumento de la actividad AGA, y mejora del flujo autofágico (40,140). Estos resultados eran menos notables cuando el daño de la fibra muscular era más importante, sugiriendo que existe una correlación entre el grado de daño muscular y la eficacia de la TRE tal como se ha señalado por diversos autores (164,166)

Nuestro estudio tiene varias limitaciones, como la ausencia de un grupo control y la falta de datos sobre la capacidad respiratoria y pruebas funcionales antes del inicio de la TRE. Esto revela la dificultad para recabar información de la función muscular y pulmonar fuera del contexto de estudios de investigación. Sin embargo, esta es una de

las mayores cohortes en la que se logra recabar datos sobre capacidades motoras en pacientes tratados más de cinco años.

En conclusion, la TRE alcanza su plateau en los primero años de tratamiento, seguido de un lento deterioro progresivo especialmente en la función motora, sobre todo a nivel de las piernas. El desarrollo de estudios de historia natural en pacientes tratados por períodos de tiempo más prolongados nos dará más información sobre la efectividad de la TRE en pacientes con EPA a largo plazo.



# **CONCLUSIONES**

## 7 CONCLUSIONES

### Objetivo principal

- I. La RNM cuantitativa, a través de la secuencia 3-point Dixon, es un biomarcador evolutivo eficaz para el seguimiento de pacientes con enfermedad de Pompe del adulto

### Objetivos secundarios

- II. La mutación más frecuentemente encontrada en este estudio fue c.-32-13T>G, con una frecuencia mayor al 80%. Esta es la mutación más común entre pacientes europeos con EPA.
- III. Tanto la secuencia T1w como 3-point Dixon objetivaron un compromiso muscular precoz de musculatura paraespinal y abdominal, así como un patrón de compromiso a nivel de muslo característico, fácilmente deducibles con heatmaps
- IV. Existe una correlación significativa entre los test de función muscular y la RNM muscular, tanto cuali- como cuantitativa
- V. Los pacientes bajo terapia de reemplazo enzimático por períodos mayores a 5 años presentan un declive de las funciones motoras, a pesar del tratamiento instaurado

# LÍNEAS DE FUTURO

## 8 LINEAS DE FUTURO

1. Ampliar el período de seguimiento de los pacientes con enfermedad de Pompe del adulto mediante RNM muscular en secuencia 3-point Dixon
2. Utilizar nuevas técnicas radiológicas, como la espectroscopía y el wáter T2, para definir la utilidad de cada una de estas secuencias en el seguimiento de pacientes
3. Investigar nuevas secuencias de RNM muscular o medicina nuclear que determinen directamente la carga de glucógeno muscular
4. Ampliar el campo de biomarcadores en EPA: uso de micro-RNA y derivados del glucógeno en orina
5. Definir variables que puedan predecir respuesta a tratamiento en pacientes bajo TRE más de cinco años

## 9 **BIBLIOGRAFÍA**

1. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2008;372(9646):1342–53. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61555-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61555-X)
2. Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Others. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med*. 2006;8(5):267–88.
3. Güngör D, Reuser AJJ. How to describe the clinical spectrum in Pompe disease? *Am J Med Genet Part A*. 2013;161(2):399–400.
4. van den Hout HMP, Hop W, van Diggelen OP, Smeitink JAM, Smit GPA, Poll-The B-TT, et al. The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature. *Pediatrics*. United States; 2003 Aug;112(2):332–40.
5. Kishnani PS, Hwu W-LL, Mandel H, Nicolino M, Yong F, Corzo D. A retrospective, multinational, multicenter study on the natural history of infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr*. United States; 2006 May;148(5):671–6.
6. Bembi B, Cerini E, Danesino C, Donati M a., Gasperini S, Morandi L, et al. Management and treatment of glycogenosis type II. *Neurology*. 2008;71.
7. Chan J, Desai AK, Kazi ZB, Corey K, Austin S, Hobson-Webb LD, et al. The emerging phenotype of late-onset Pompe disease: A systematic literature review. *Mol Genet Metab* [Internet]. Elsevier Inc; 2017;120(3):163–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.12.004>
8. Hagemans MLC, Winkel LPF, Van Doorn P a., Hop WJC, Loonen MCB, Reuser a. JJ, et al. Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients. *Brain*. 2005;128(3):671–7.
9. van der Beek N a ME, de Vries JM, Hagemans MLC, Hop WCJ, Kroos M a, Wokke JHJ, et al. Clinical features and predictors for disease natural progression in adults with Pompe disease: a nationwide prospective observational study. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. Orphanet Journal of Rare Diseases; 2012;7(1):88. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3551719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

10. Leslie N, Bailey L. Pompe Disease. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al., editors. Seattle (WA); 1993.
11. Ausems MG, Verbiest J, Hermans MP, Kroos M a, Beemer F a, Wokke JH, et al. Frequency of glycogen storage disease type II in The Netherlands: implications for diagnosis and genetic counselling. *Eur J Hum Genet.* 1999;7(6):713–6.
12. Martiniuk F, Chen A, Mack A, Arvanitopoulos E, Chen Y, Rom WN, et al. Carrier frequency for glycogen storage disease type II in New York and estimates of affected individuals born with the disease. *Am J Med Genet.* 1998;79(May):69–72.
13. Chien Y-H, Chiang S-C, Zhang XK, Keutzer J, Lee N-C, Huang A-C, et al. Early detection of Pompe disease by newborn screening is feasible: results from the Taiwan screening program. *Pediatrics.* United States; 2008 Jul;122(1):e39-45.
14. Lukacs Z, Cobos PN, Wenninger S, Willis TA, Guglieri M, Roberts M, et al. Prevalence of Pompe disease in 3,076 patients with hyperCKemia and limb-girdle muscular weakness. *Neurology.* 2016;87(3):295–8.
15. Gutiérrez-Rivas E, Bautista J, Vílchez JJ, Muelas N, Díaz-Manera J, Illa I, et al. Targeted screening for the detection of Pompe disease in patients with unclassified limb-girdle muscular dystrophy or asymptomatic hyperCKemia using dried blood: A Spanish cohort. *Neuromuscul Disord* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;25(7):548–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25998610>
16. Musumeci O, la Marca G, Spada M, Mondello S, Danesino C, Comi GP, et al. LOPED study: looking for an early diagnosis in a late-onset Pompe disease high-risk population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* England; 2016 Jan;87(1):5–11.
17. Palmio J, Auranen M, Kiuru-Enari S, Löfberg M, Bodamer O, Udd B. Screening for late-onset Pompe disease in Finland. *Neuromuscul Disord.* 2014;24(11):982–5.
18. Preisler N, Lukacs Z, Vinge L, Madsen KL, Husu E, Hansen RS, et al. Late-onset Pompe disease is prevalent in unclassified limb-girdle muscular dystrophies. *Mol Genet Metab* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;110(3):287–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.08.005>
19. Pérez-López J, Selva-O’Callaghan A, Grau-Junyent JM, Gallego-Galindo L, Coll MJ, García-Morillo S, et al. Delayed diagnosis of late-onset Pompe disease

- in patients with myopathies of unknown origin and/or hyperCKemia. *Mol Genet Metab* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;114(4):580–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.02.004>
20. Guimaraes MJ, Winck JC, Conde B, Mineiro A, Raposo M, Moita J, et al. Prevalence of late-onset pompe disease in Portuguese patients with diaphragmatic paralysis - DIPPER study. *Rev Port Pneumol. Spain*; 2017 Jul;23(4):208–15.
  21. Hermans MMP, van Leenen D, Kroos MA, Beesley CE, Van Der Ploeg AT, Sakuraba H, et al. Twenty-two novel mutations in the lysosomal alpha-glucosidase gene (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II. *Hum Mutat. United States*; 2004 Jan;23(1):47–56.
  22. Kishnani PS, Abbott MA, Chien Y-H, Clemens PR, Kimonis VE, Leslie N, et al. Sequence variants and genotypes among 898 patients with Pompe disease: data from the Pompe Registry. *Mol Genet Metab.* 2017;120(1):2016.
  23. Kroos MA, Pomponio RJ, Hagemans ML, Keulemans JLM, Phipps M, DeRiso M, et al. Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13T->G haplotype. *Neurology. United States*; 2007 Jan;68(2):110–5.
  24. De Filippi P, Saeidi K, Ravaglia S, Dardis A, Angelini C, Mongini T, et al. Genotype-phenotype correlation in Pompe disease, a step forward. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2014;9:102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103075>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4249737>
  25. Kroos M, Hoogeveen-Westerveld M, van der Ploeg A, Reuser AJJ. The genotype-phenotype correlation in Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet. United States*; 2012 Feb;160C(1):59–68.
  26. Manuscript A, Berardo A, DiMauro S, Hirano M. A Diagnostic Algorithm for Metabolic Myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep. United States*; 2011 Mar;10(2):118–26.
  27. Thurberg BL, Maloney CL, Vaccaro C, Afonso K, Tsai ACH, Bossen EH, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Investig.* 2006;86(12):1208–20.
  28. Raben N, Plotz P, Byrne BJ. Acid alpha-glucosidase deficiency (glycogenosis type

- II, Pompe disease). *Curr Mol Med. Netherlands*; 2002 Mar;2(2):145–66.
29. Raben N, Roberts A, Plotz PH. Role of autophagy in the pathogenesis of Pompe disease. *Acta Myol myopathies cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol. Italy*; 2007 Jul;26(1):45–8.
  30. Raben N, Ralston E, Chien Y-H, Baum R, Schreiner C, Hwu W-L, et al. Differences in the predominance of lysosomal and autophagic pathologies between infants and adults with Pompe disease: implications for therapy. *Mol Genet Metab. United States*; 2010 Dec;101(4):324–31.
  31. Raben N, Baum R, Schreiner C, Takikita S, Mizushima N, Ralston E, et al. When more is less: Excess and deficiency of autophagy coexist in skeletal muscle in Pompe disease. *Autophagy. United States*; 2009 Jan;5(1):111–3.
  32. Sandri M, Coletto L, Grumati P, Bonaldo P. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J Cell Sci [Internet]*. 2013;126(23):5325–33. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.114041>
  33. Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol. United States*; 2012 Nov;199(5):723–34.
  34. Lim J-A, Li L, Raben N. Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. *Front Aging Neurosci [Internet]*. 2014;6(July):1–14. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2014.00177/abstract>
  35. Shea L, Raben N. Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease. *Int J Clin Pharmacol Ther. Germany*; 2009;47 Suppl 1:S42-7.
  36. Nascimbeni AC, Fanin M, Masiero E, Angelini C, Sandri M. Impaired autophagy contributes to muscle atrophy in glycogen storage disease type II patients. *Autophagy*. 2012;8(11):1697–700.
  37. Nascimbeni AC, Fanin M, Masiero E, Angelini C, Sandri M. The role of autophagy in the pathogenesis of glycogen storage disease type II (GSDII). *Cell Death Differ [Internet]*. Nature Publishing Group; 2012;19(10):1698–708. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cdd.2012.52>
  38. Salminen A, Kaarniranta K. Regulation of the aging process by autophagy. *Trends Mol Med. England*; 2009 May;15(5):217–24.



39. Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, et al. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab.* United States; 2009 Dec;10(6):507–15.
40. Ripolone M, Violano R, Ronchi D, Mondello S, Nascimbeni A, Colombo I, et al. Effects of short-to-long term enzyme replacement therapy (ERT) on skeletal muscle tissue in late onset Pompe disease (LOPD). *Neuropathol Appl Neurobiol.* England; 2017 Jun;
41. Al Jasmi F, Al Jumah M, Alqarni F, Al-Sanna'a N, Al-Sharif F, Bohlega S, et al. Diagnosis and treatment of late-onset Pompe disease in the Middle East and North Africa region: consensus recommendations from an expert group. *BMC Neurol* [Internet]. *BMC Neurology*; 2015;15(1):205. Available from: <http://bmcneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12883-015-0412-3>
42. Malicdan MC V, Nishino I. Autophagy in lysosomal myopathies. *Brain Pathol.* Switzerland; 2012 Jan;22(1):82–8.
43. Osellame LD, Duchen MR. Quality control gone wrong: mitochondria, lysosomal storage disorders and neurodegeneration. *Br J Pharmacol.* England; 2014 Apr;171(8):1958–72.
44. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):9–14.
45. Lim J-A, Kakhlon O, Li L, Myerowitz R, Raben N. Pompe disease: Shared and unshared features of lysosomal storage disorders. *Rare Dis* [Internet]. 2015;3(1):e1068978. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21675511.2015.1068978>
46. Bembi B, Cerini E, Danesino C, Donati MA, Gasperini S, Morandi L, et al. Diagnosis of glycogenosis type II. *Neurology* [Internet]. 2008 Dec 2;71(23 Suppl 2):S4–11. Available from: [http://www.neurology.org/content/71/23\\_suppl\\_2/S4.abstract](http://www.neurology.org/content/71/23_suppl_2/S4.abstract)
47. Muller-Felber W, Horvath R, Gempel K, Podskarbi T, Shin Y, Pongratz D, et al. Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *Neuromuscul Disord.* England; 2007 Oct;17(9–10):698–706.
48. Mellies U, Lofaso F. Pompe disease: a neuromuscular disease with respiratory muscle involvement. *Respir Med.* England; 2009 Apr;103(4):477–84.

49. Montagnese F, Granata F, Musumeci O, Rodolico C, Mondello S, Barca E, et al. Intracranial arterial abnormalities in patients with late onset Pompe disease (LOPD). *J Inher Metab Dis*. 2016;39(3):391–8.
50. Hobson-Webb LD, Proia AD, Thurberg BL, Banugaria S, Prater SN, Kishnani PS. Autopsy findings in late-onset Pompe disease: a case report and systematic review of the literature. *Mol Genet Metab*. United States; 2012 Aug;106(4):462–9.
51. Broomfield A, Fletcher J, Hensman P, Wright R, Prunty H, Pavaine J, et al. Rapidly Progressive White Matter Involvement in Early Childhood: The Expanding Phenotype of Infantile Onset Pompe? *JIMD Rep*. Germany; 2017 Jul;
52. Soliman OII, van der Beek NAME, van Doorn PA, Vletter WB, Nemes A, Van Dalen BM, et al. Cardiac involvement in adults with Pompe disease. *J Intern Med*. England; 2008 Oct;264(4):333–9.
53. Forsha D, Li JS, Smith PB, van der Ploeg AT, Kishnani P, Pasquali SK. Cardiovascular abnormalities in late-onset Pompe disease and response to enzyme replacement therapy. *Genet Med*. United States; 2011 Jul;13(7):625–31.
54. Sacconi S, Wahbi K, Theodore G, Garcia J, Salviati L, Bouhour F, et al. Atrio-ventricular block requiring pacemaker in patients with late onset Pompe disease. *Neuromuscul Disord*. England; 2014 Jul;24(7):648–50.
55. Wens SCA, Kuperus E, Mattace-Raso FUS, Kruijshaar ME, Brusse E, van Montfort KCAGM, et al. Increased aortic stiffness and blood pressure in non-classic Pompe disease. *J Inher Metab Dis*. Netherlands; 2014 May;37(3):391–7.
56. van den Berg LEM, Zandbergen AA, van Capelle CI, de Vries JM, Hop WC, van den Hout JM, et al. Low bone mass in Pompe disease: muscular strength as a predictor of bone mineral density. *Bone*. United States; 2010 Sep;47(3):643–9.
57. Schuller A, Wenninger S, Strigl-Pill N, Schoser B. Toward deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. United States; 2012 Feb;160C(1):80–8.
58. Dubrovsky A, Corderi J, Lin M, Kishnani PS, Jones HN. Expanding the phenotype of late-onset Pompe disease: tongue weakness: a new clinical observation. *Muscle Nerve*. United States; 2011 Dec;44(6):897–901.
59. Jones HN, Crisp KD, Asrani P, Sloane R, Kishnani PS. Quantitative assessment of lingual strength in late-onset Pompe disease. *Muscle Nerve*. United States; 2015 May;51(5):731–5.

60. Bernstein DL, Bialer MG, Mehta L, Desnick RJ. Pompe disease: dramatic improvement in gastrointestinal function following enzyme replacement therapy. A report of three later-onset patients. *Mol Genet Metab.* United States; 2010;101(2–3):130–3.
61. Pichiecchio A, Uggetti C, Ravaglia S, Egitto MG, Rossi M, Sandrini G, et al. Muscle MRI in adult-onset acid maltase deficiency. *Neuromuscul Disord.* 2004;14(1):51–5.
62. McIntosh PT, Case LE, Chan JM, Austin SL, Kishnani P. Characterization of gait in late onset Pompe disease. *Mol Genet Metab* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;116(3):152–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.12.171>
63. Garibaldi M, Diaz-Manera J, Gallardo E, Antonini G. Teaching Video NeuroImages: The Beevor sign in late-onset Pompe disease. *Neurology.* United States; 2016 Jun;86(24):e250-1.
64. Boentert M, Karabul N, Wenninger S, Stubbe-Dräger B, Mengel E, Schoser B, et al. Sleep-related symptoms and sleep-disordered breathing in adult Pompe disease. *Eur J Neurol* [Internet]. England; 2015 Feb;22(2):369–76, e27. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ene.12582>
65. van der Beek NAME, van Capelle CI, van der Velden-van Etten KI, Hop WCJ, van den Berg B, Reuser AJJ, et al. Rate of progression and predictive factors for pulmonary outcome in children and adults with Pompe disease. *Mol Genet Metab* [Internet]. United States: Elsevier Inc.; 2011;104(1–2):129–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.06.012>
66. ATS/ERS Statement on respiratory muscle testing. *Am J Respir Crit Care Med.* United States; 2002 Aug;166(4):518–624.
67. Kretzschmar HA, Wagner H, Hubner G, Danek A, Witt TN, Mehraein P. Aneurysms and vacuolar degeneration of cerebral arteries in late-onset acid maltase deficiency. *J Neurol Sci.* Netherlands; 1990 Sep;98(2–3):169–83.
68. Montagnese F, Barca E, Musumeci O, Mondello S, Migliorato A, Ciranni A, et al. Clinical and molecular aspects of 30 patients with late-onset Pompe disease (LOPD): unusual features and response to treatment. *J Neurol.* Germany; 2015;262(4):968–78.
69. Ausems MG, Lochman P, van Diggelen OP, Ploos van Amstel HK, Reuser AJ,

- Wokke JH. A diagnostic protocol for adult-onset glycogen storage disease type II. *Neurology*. UNITED STATES; 1999 Mar;52(4):851–3.
70. Prigent H, Orlikowski D, Laforet P, Letilly N, Falaize L, Pellegrini N, et al. Supine volume drop and diaphragmatic function in adults with Pompe disease. *Vol. 39, The European respiratory journal*. England; 2012. p. 1545–6.
  71. Carlier RY, Laforet P, Wary C, Mompoin D, Laloui K, Pellegrini N, et al. Whole-body muscle MRI in 20 patients suffering from late onset Pompe disease: Involvement patterns. *Neuromuscul Disord* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;21(11):791–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2011.06.748>
  72. Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, et al. Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: report from an international consensus meeting. *Mol Genet Metab*. United States; 2008 Mar;93(3):275–81.
  73. Umapathysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ. Determination of acid alpha-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. *Clin Chem*. United States; 2001 Aug;47(8):1378–83.
  74. Kroos MA, Mullaart RA, Van Vliet L, Pomponio RJ, Amartino H, Kolodny EH, et al. p.[G576S; E689K]: pathogenic combination or polymorphism in Pompe disease? *Eur J Hum Genet*. England; 2008 Aug;16(8):875–9.
  75. Kumamoto S, Katafuchi T, Nakamura K, Endo F, Oda E, Okuyama T, et al. High frequency of acid alpha-glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese population. *Mol Genet Metab*. United States; 2009 Jul;97(3):190–5.
  76. Vissing J, Lukacs Z, Straub V. Diagnosis of Pompe disease: muscle biopsy vs blood-based assays. *JAMA Neurol* [Internet]. 2013;70(7):923–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23649721>
  77. Van den Hout H, Reuser AJJ, Vulto AG, Christa B Loonen M, Cromme-Dijkhuis A, Van der Ploeg AT. Recombinant human  $\alpha$ -glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet* [Internet]. Elsevier; 2015 Jun 3;356(9227):397–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02533-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02533-2)
  78. Broomfield A, Fletcher J, Davison J, Finnegan N, Fenton M, Chikermane A, et al. Response of 33 UK patients with infantile-onset Pompe disease to enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis*. Netherlands; 2016 Mar;39(2):261–71.

79. Kishnani PS, Goldenberg PC, DeArme SL, Heller J, Benjamin D, Young S, et al. Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Mol Genet Metab*. United States; 2010 Jan;99(1):26–33.
80. van der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, Escolar DM, Florence J, Groeneveld GJ, et al. A randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2010;362(15):1396–406. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0909859>
81. Schoser B, Stewart A, Kanters S, Hamed A, Jansen J, Chan K, et al. Survival and long-term outcomes in late-onset Pompe disease following alglucosidase alfa treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*. Springer Berlin Heidelberg; 2017;264(4):621–30.
82. Kuperus E, Kruijshaar ME, Wens SC, de Vries JM, Favejee MM, van der Meijden JC, et al. Long-term benefit of enzyme replacement therapy in Pompe disease. 2017;1–10.
83. Kishnania P, Chien Y-H, Llerena J, Kempf J, Devecseri Z, van der Ploeg A. The Pompe Registry: 10 Years of Data. *J Neuromuscul Dis*. Netherlands; 2015;2(s1):S22–3.
84. Byrne BJ, Kishnani PS, Case LE, Merlini L, Müller-Felber W, Prasad S, et al. Pompe disease: Design, methodology, and early findings from the Pompe Registry. *Mol Genet Metab* [Internet]. United States: Elsevier B.V.; 2011 May;103(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.02.004>
85. van der Ploeg AT, Kruijshaar ME, Toscano A, Laforêt P, Angelini C, Lachmann RH, et al. European consensus for starting and stopping enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year experience. *Eur J Neurol*. 2017;24(6):768-e31.
86. Cupler EJ, Berger KI, Leshner RT, Wolfe GI, Han JJ, Barohn RJ, et al. Consensus treatment recommendations for late-onset pompe disease. *Muscle and Nerve*. 2012;45(3):319–33.
87. Gutierrez-Rivas E, Illa I, Pascual-Pascual SI, Perez-Lopez J, Vilchez-Padilla JJ, Bautista-Lorite J, et al. [Guidelines for monitoring late-onset Pompe disease. Sociedad Espanola de Medicina Interna (SEMI), Sociedad Espanola de Neurologia (SEN) y Sociedad Espanola de Neumologia y Cirugia Toracica (SEPAR)]. *Rev Neurol*. Spain; 2015 Apr;60(7):321–8.

88. ten Dam L, van der Kooi AJ, Verhamme C, Wattjes MP, de Visser M. Muscle imaging in inherited and acquired muscle diseases. *Eur J Neurol.* 2016;23(4):688–703.
89. Van De Vlekkert J, Maas M, Hoogendijk JE, De Visser M, Van Schaik IN. Combining MRI and muscle biopsy improves diagnostic accuracy in subacute-onset idiopathic inflammatory myopathy. *Muscle Nerve.* United States; 2015 Feb;51(2):253–8.
90. Mercuri E, Clements E, Offiah A, Pichiecchio A, Vasco G, Bianco F, et al. Muscle magnetic resonance imaging involvement in muscular dystrophies with rigidity of the spine. *Ann Neurol.* United States; 2010 Feb;67(2):201–8.
91. Phillips BA, Cala LA, Thickbroom GW, Melsom A, Zilko PJ, Mastaglia FL. Patterns of muscle involvement in inclusion body myositis: clinical and magnetic resonance imaging study. *Muscle Nerve.* United States; 2001 Nov;24(11):1526–34.
92. Willis TA, Hollingsworth KG, Coombs A, Sveen M-L, Andersen S, Stojkovic T, et al. Quantitative Magnetic Resonance Imaging in Limb-Girdle Muscular Dystrophy 21: A Multinational Cross-Sectional Study. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(2):e90377. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0090377>
93. Ten Dam L, van der Kooi AJ, Rovekamp F, Linssen WHJP, de Visser M. Comparing clinical data and muscle imaging of DYSF and ANO5 related muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord.* England; 2014 Dec;24(12):1097–102.
94. Mercuri E, Pichiecchio A, Counsell S, Allsop J, Cini C, Jungbluth H, et al. A short protocol for muscle MRI in children with muscular dystrophies. *Eur J Paediatr Neurol.* 2002;6(6):305–7.
95. Mercuri E, Cini C, Counsell S, Allsop J, Zolkipli Z, Jungbluth H, et al. Muscle MRI findings in a three-generation family affected by Bethlem myopathy. *Eur J Paediatr Neurol.* England; 2002;6(6):309–14.
96. Morrow JM, Matthews E, Raja Rayan DL, Fischmann A, Sinclair CDJ, Reilly MM, et al. Muscle MRI reveals distinct abnormalities in genetically proven non-dystrophic myotonias. *Neuromuscul Disord.* England; 2013 Aug;23(8):637–46.
97. Goehde SC, Hunold P, Vogt FM, Ajaj W, Goyen M, Herborn CU, et al. Full-body cardiovascular and tumor MRI for early detection of disease: feasibility and initial experience in 298 subjects. *AJR Am J Roentgenol.* United States; 2005

Feb;184(2):598–611.

98. Schramm N, Born C, Weckbach S, Reilich P, Walter MC, Reiser MF. Involvement patterns in myotilinopathy and desminopathy detected by a novel neuromuscular whole-body MRI protocol. *Eur Radiol. Germany*; 2008 Dec;18(12):2922–36.
99. 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 Neurol Scand. Denmark*; 2009 Aug;120(2):111–8.
100. Quijano-Roy S, Avila-Smirnow D, Carlier RY, Allamand V, Barois A, Barnerias C, et al. Whole body muscle MRI protocol: Pattern recognition in early onset NM disorders. *Neuromuscul Disord* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;22:S68–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2012.08.003>
101. Morrow JM, Sinclair CDJ, Fischmann A, Reilly MM, Hanna MG, Yousry TA, et al. Reproducibility, and age, body-weight and gender dependency of candidate skeletal muscle MRI outcome measures in healthy volunteers. *Eur Radiol. Germany*; 2014 Jul;24(7):1610–20.
102. Morrow JM, Sinclair CDJ, Fischmann A, Machado PM, Reilly MM, Yousry TA, et al. MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: A prospective observational cohort study. *Lancet Neurol* [Internet]. Morrow et al. Open Access article distributed under the terms of CC BY 4.0.; 2015;15(1):65–77. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00242-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00242-2)
103. Gloor M, Fasler S, Fischmann A, Haas T, Bieri O, Heinimann K, et al. Quantification of fat infiltration in oculopharyngeal muscular dystrophy: Comparison of three MR imaging methods. *J Magn Reson Imaging. 2011*;33(1):203–10.
104. Willcocks RJ, Rooney WD, Triplett WT, Forbes SC, Lott DJ, Senesac CR, et al. Multicenter prospective longitudinal study of magnetic resonance biomarkers in a large duchenne muscular dystrophy cohort. *Ann Neurol* [Internet]. United States; 2016 Apr;79(4):n/a-n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.24599>
105. Ma J. Dixon techniques for water and fat imaging. *J Magn Reson Imaging. United States*; 2008 Sep;28(3):543–58.
106. Burakiewicz J, Sinclair CDJ, Fischer D, Walter GA, Kan HE, Hollingsworth KG. Quantifying fat replacement of muscle by quantitative MRI in muscular dystrophy.

- J Neurol. Springer Berlin Heidelberg; 2017;264(10):2053–67.
107. Fischmann A, Morrow JM, Sinclair CDJ, Reilly MM, Hanna MG, Yousry T, et al. Improved anatomical reproducibility in quantitative lower-limb muscle MRI. *J Magn Reson Imaging*. United States; 2014 Apr;39(4):1033–8.
  108. Hu HH, Bornert P, Hernando D, Kellman P, Ma J, Reeder S, et al. ISMRM workshop on fat-water separation: insights, applications and progress in MRI. Vol. 68, *Magnetic resonance in medicine*. United States; 2012. p. 378–88.
  109. Eggers H, Bornert P. Chemical shift encoding-based water-fat separation methods. *J Magn Reson Imaging*. United States; 2014 Aug;40(2):251–68.
  110. Janiczek RL, Gambarota G, Sinclair CDJ, Yousry TA, Thornton JS, Golay X, et al. Simultaneous T(2) and lipid quantitation using IDEAL-CPMG. *Magn Reson Med*. United States; 2011 Nov;66(5):1293–302.
  111. Mankodi A, Bishop CA, Auh S, Newbould RD, Fischbeck KH, Janiczek RL. Quantifying disease activity in fatty-infiltrated skeletal muscle by IDEAL-CPMG in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. England; 2016 Oct;26(10):650–8.
  112. Arpan I, Willcocks RJ, Forbes SC, Finkel RS, Lott DJ, Rooney WD, et al. Examination of effects of corticosteroids on skeletal muscles of boys with DMD using MRI and MRS. *Neurology*. United States; 2014 Sep;83(11):974–80.
  113. Lott DJ, Forbes SC, Mathur S, Germain SA, Senesac CR, Lee Sweeney H, et al. Assessment of intramuscular lipid and metabolites of the lower leg using magnetic resonance spectroscopy in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. England; 2014 Jul;24(7):574–82.
  114. Forbes SC, Walter GA, Rooney WD, Wang D-J, DeVos S, Pollaro J, et al. Skeletal muscles of ambulant children with Duchenne muscular dystrophy: validation of multicenter study of evaluation with MR imaging and MR spectroscopy. *Radiology*. United States; 2013 Oct;269(1):198–207.
  115. Wokke BH, Bos C, Reijnierse M, Van Rijswijk CS, Eggers H, Webb A, et al. Comparison of dixon and T1-weighted MR methods to assess the degree of fat infiltration in duchenne muscular dystrophy patients. *J Magn Reson Imaging*. United States; 2013 Sep;38(3):619–24.
  116. Commean PK, Tuttle LJ, Hastings MK, Strube MJ, Mueller MJ. Magnetic resonance imaging measurement reproducibility for calf muscle and adipose



- tissue volume. *J Magn Reson Imaging*. United States; 2011 Dec;34(6):1285–94.
117. Wokke BH, van den Bergen JC, Versluis MJ, Niks EH, Milles J, Webb AG, et al. Quantitative MRI and strength measurements in the assessment of muscle quality in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* [Internet]. England: Elsevier B.V.; 2014 May;24(5):409–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2014.01.015>
  118. Wary C, Azzabou N, Giraudeau C, Le Louer J, Montus M, Voit T, et al. Quantitative NMRI and NMRS identify augmented disease progression after loss of ambulation in forearms of boys with Duchenne muscular dystrophy. *NMR Biomed*. England; 2015 Sep;28(9):1150–62.
  119. Ricotti V, Evans MRB, Sinclair CDJ, Butler JW, Ridout DA, Hogrel J-Y, et al. Upper Limb Evaluation in Duchenne Muscular Dystrophy: Fat-Water Quantification by MRI, Muscle Force and Function Define Endpoints for Clinical Trials. *PLoS One*. United States; 2016;11(9):e0162542.
  120. Hogrel J-Y, Wary C, Moraux A, Azzabou N, Decostre V, Ollivier G, et al. Longitudinal functional and NMR assessment of upper limbs in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. United States; 2016 Mar;86(11):1022–30.
  121. Fischmann A, Hafner P, Fasler S, Gloor M, Bieri O, Studler U, et al. Quantitative MRI can detect subclinical disease progression in muscular dystrophy. *J Neurol*. Germany; 2012 Aug;259(8):1648–54.
  122. Bonati U, Holiga S, Hellbach N, Risterucci C, Bergauer T, Tang W, et al. Longitudinal characterization of biomarkers for spinal muscular atrophy. *Ann Clin Transl Neurol*. United States; 2017 May;4(5):292–304.
  123. Bonati U, Hafner P, Schadelin S, Schmid M, Naduvilekoot Devasia A, Schroeder J, et al. Quantitative muscle MRI: A powerful surrogate outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. England; 2015 Sep;25(9):679–85.
  124. Andersen G, Dahlqvist JR, Vissing CR, Heje K, Thomsen C, Vissing J. MRI as outcome measure in facioscapulohumeral muscular dystrophy: 1-year follow-up of 45 patients. *J Neurol*. Germany; 2017 Mar;264(3):438–47.
  125. Carlier PG, Azzabou N, de Sousa PL, Hicks A, Boisserie J-M, Amadon A, et al. Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging follow-up of adult Pompe patients. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2015; Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/s10545-015-9825-9>

126. Pichiecchio A, Berardinelli A, Moggio M, Rossi M, Balottin U, Comi G Pietro, et al. Asymptomatic Pompe disease: Can muscle magnetic resonance imaging facilitate diagnosis? *Muscle Nerve*. United States; 2016 Feb;53(2):326–7.
127. van Zijl PCM, Jones CK, Ren J, Malloy CR, Sherry AD. MRI detection of glycogen in vivo by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST). *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States; 2007 Mar;104(11):4359–64.
128. Heinicke K, Dimitrov IE, Romain N, Cheshkov S, Ren J, Malloy CR, et al. Reproducibility and absolute quantification of muscle glycogen in patients with glycogen storage disease by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy at 7 Tesla. *PLoS One*. United States; 2014;9(10):e108706.
129. de Jager AE, van der Vliet TM, van der Ree TC, Oosterink BJ, Loonen MC. Muscle computed tomography in adult-onset acid maltase deficiency. *Muscle Nerve*. UNITED STATES; 1998 Mar;21(3):398–400.
130. Cinnamon J, Slonim AE, Black KS, Gorey MT, Scuderi DM, Hyman RA. Evaluation of the lumbar spine in patients with glycogen storage disease: CT demonstration of patterns of paraspinal muscle atrophy. *AJNR Am J Neuroradiol*. United States; 1991;12(6):1099–103.
131. Dlamini N, Jan W, Norwood F, Sheehan J, Spahr R, Al-Sarraj S, et al. Muscle MRI findings in siblings with juvenile-onset acid maltase deficiency (Pompe disease). *Neuromuscul Disord*. England; 2008 May;18(5):408–9.
132. Alejaldre A, Díaz-Manera J, Ravaglia S, Tibaldi EC, D'Amore F, Morís G, et al. Trunk muscle involvement in late-onset Pompe disease: Study of thirty patients. *Neuromuscul Disord*. 2012;22:148–54.
133. Carlier PG, Marty B, Scheidegger O, Loureiro de Sousa P, Baudin P-Y, Snezhko E, et al. Skeletal Muscle Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy as an Outcome Measure for Clinical Trials. *J Neuromuscul Dis* [Internet]. 2016;3(1):1–28. Available from: <http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JND-160145>
134. Pichiecchio A, Rossi M, Cinnante C, Colafati GS, De Icco R, Parini R, et al. Muscle MRI of classic infantile pompe patients: Fatty substitution and edema-like changes. *Muscle Nerve*. United States; 2017 Jun;55(6):841–8.

135. Pichiecchio A, Poloni GU, Ravaglia S, Ponzio M, Germani G, Maranzana D, et al. Enzyme replacement therapy in adult-onset glycogenosis II: Is quantitative muscle MRI helpful? *Muscle and Nerve*. 2009;40(1):122–5.
136. Horvath JJ, Austin SL, Case LE, Greene KB, Jones HN, Soher BJ, et al. Correlation between quantitative whole-body muscle magnetic resonance imaging and clinical muscle weakness in pompe disease. *Muscle and Nerve*. 2015;51(5):722–30.
137. Gruhn KM, Heyer CM, G??ttsches AK, Rehmann R, Nicolas V, Schmidt-Wilcke T, et al. Muscle imaging data in late-onset Pompe disease reveal a correlation between the pre-existing degree of lipomatous muscle alterations and the efficacy of long-term enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab Reports* [Internet]. The Authors; 2015;3:58–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2015.03.010>
138. Mattei JP, Fur Y Le, Cuge N, Guis S, Cozzone PJ, Bendahan D. Segmentation of fascias, fat and muscle from magnetic resonance images in humans: the DISPIMAG software. *MAGMA*. Germany; 2006 Nov;19(5):275–9.
139. Pichiecchio A, Uggetti C, Egitto MG, Berardinelli A, Orcesi S, Gorni KOT, et al. Quantitative MR evaluation of body composition in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Eur Radiol*. Germany; 2002 Nov;12(11):2704–9.
140. van der Ploeg A, Carlier PG, Carlier RY, Kissel JT, Schoser B, Wenninger S, et al. Prospective exploratory muscle biopsy, imaging, and functional assessment in patients with late-onset Pompe disease treated with alglucosidase alfa: The EMBASSY Study. *Mol Genet Metab* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;119(1–2):115–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.05.013>
141. Kroos M, Pomponio RJ, van Vliet L, Palmer RE, Phipps M, Van der Helm R, et al. Update of the Pompe disease mutation database with 107 sequence variants and a format for severity rating. *Hum Mutat*. United States; 2008 Jun;29(6):E13-26.
142. R. Hirschhorn AJR. Glycogen Storage Disease Type II: Acid Alpha-Gluco- sidase (Acid Maltase) Deficiency. In: C.R. Scriver DV (Eds. ., editor. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. eighth ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 3389–3420.
143. Harris E, Bladen CL, Mayhew A, James M, Bettinson K, Moore U, et al. The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy: An international multicenter study.

- Neurol Genet. United States; 2016 Aug;2(4):e89.
144. Vandervelde L, Van den Bergh PYK, Goemans N, Thonnard J-L. ACTIVLIM: a Rasch-built measure of activity limitations in children and adults with neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord*. England; 2007 Jun;17(6):459–69.
  145. Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K, et al. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurology*. United States; 2008 Sep;71(10):758–65.
  146. Hollingsworth KG. Quantitative MRI in muscular dystrophy. 2014;956–8.
  147. Díaz-Manera J, Llauger J, Gallardo E, Illa I. Muscle MRI in muscular dystrophies. *Acta Myol* [Internet]. 2015;34(2–3):95–108. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27199536> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4859076>
  148. Wallace GQ, McNally EM. Mechanisms of Muscle Degeneration, Regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2009;71(1):37–57. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.010908.163216>
  149. Straub V, Balabanov P, Bushby K, Ensini M, Goemans N, De Luca A, et al. Stakeholder cooperation to overcome challenges in orphan medicine development: the example of Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol*. England; 2016 Jul;15(8):882–90.
  150. Fatehi F, Salort-Campana E, Le Troter A, Bendahan D, Attarian S. Muscle MRI of facioscapulohumeral dystrophy (FSHD): A growing demand and a promising approach. *Rev Neurol (Paris)*. France; 2016 Oct;172(10):566–71.
  151. Straub V, Bertoli M. Where do we stand in trial readiness for autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies? *Neuromuscul Disord*. England; 2016 Feb;26(2):111–25.
  152. Grolez G, Moreau C, Danel-Brunaud V, Delmaire C, Lopes R, Pradat PF, et al. The value of magnetic resonance imaging as a biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *BMC Neurol*. England; 2016 Aug;16(1):155.
  153. Willis TA, Hollingsworth KG, Coombs A, Sveen ML, Andersen S, Stojkovic T, et al. Quantitative Muscle MRI as an Assessment Tool for Monitoring Disease Progression in LGMD2I: A Multicentre Longitudinal Study. *PLoS One*. 2013;8(8):6–13.

154. Raben N, Wong A, Ralston E, Myerowitz R. Autophagy and mitochondria in Pompe disease: nothing is so new as what has long been forgotten. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. United States; 2012 Feb;160C(1):13–21.
155. Filli L, Winklhofer S, Andreisek G, Del Grande F. Imaging of Myopathies. *Radiol Clin North Am*. United States; 2017 Sep;55(5):1055–70.
156. Azzabou N, Carlier PG. Fat quantification and T2 measurement. Vol. 44, *Pediatric radiology*. Germany; 2014. p. 1620–1.
157. Kim HK, Serai S, Lindquist D, Merrow AC, Horn PS, Kim DH, et al. Quantitative Skeletal Muscle MRI: Part 2, MR Spectroscopy and T2 Relaxation Time Mapping- Comparison Between Boys With Duchenne Muscular Dystrophy and Healthy Boys. *AJR Am J Roentgenol*. United States; 2015 Aug;205(2):W216-23.
158. van der Ploeg AT, Barohn R, Carlson L, Charrow J, Clemens PR, Hopkin RJ, et al. Open-label extension study following the Late-Onset Treatment Study (LOTS) of alglucosidase alfa. *Mol Genet Metab*. United States; 2012 Nov;107(3):456–61.
159. Hankiewicz K, Carlier RY, Lazaro L, Linzoain J, Barnerias C, Gómez-Andrés D, et al. Whole-body muscle magnetic resonance imaging in SEPN1-related myopathy shows a homogeneous and recognizable pattern. *Muscle and Nerve*. 2015;52(5):728–35.
160. Fischer D, Bonati U, Wattjes MP. Recent developments in muscle imaging of neuromuscular disorders. *Curr Opin Neurol* [Internet]. 2016;29(5):614–20. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00019052-900000000-99306%5Cnhttp://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00019052-201610000-00012>
161. Hagemans MLC, Winkel LPF, Hop WCJ, Reuser AJJ, Van Doorn PA, Van der Ploeg AT. Disease severity in children and adults with Pompe disease related to age and disease duration. *Neurology*. United States; 2005 Jun;64(12):2139–41.
162. Winkel LPF, Hagemans MLC, van Doorn PA, Loonen MCB, Hop WJC, Reuser AJJ, et al. The natural course of non-classic Pompe's disease; a review of 225 published cases. *J Neurol*. Germany; 2005 Aug;252(8):875–84.
163. Wokke JHJ, Escolar DM, Pestronk A, Jaffe KM, Carter GT, van den Berg LH, et al. Clinical features of late-onset Pompe disease: A prospective cohort study.

Muscle Nerve [Internet]. 2008;38(4):1236–45. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mus.21025>

164. Angelini C, Semplicini C, Ravaglia S, Bembi B, Servidei S, Pegoraro E, et al. Observational clinical study in juvenile-adult glycogenosis type 2 patients undergoing enzyme replacement therapy for up to 4 years. *J Neurol*. 2012;259(5):952–8.
165. Toscano A, Schoser B. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: A systematic literature review. *J Neurol*. 2013;260(4):951–9.
166. Güngör D, Kruijshaar MEME, Plug I, D'Agostino RBRB, Hagemans MLML, van Doorn P a, et al. Impact of enzyme replacement therapy on survival in adults with Pompe disease: results from a prospective international observational study. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. *Orphanet Journal of Rare Diseases*; 2013;8(1):49. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3623847&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

## **10 ANEXOS**

Anexo 1 –Muscle MRI Findings in Childhood/Adult Onset Pompe Disease Correlate with Muscle Function. Figueroa-Bonaparte S, Segovia S, Llauger J, Belmonte I, Pedrosa I, Alejaldre A, et al. (2016) PLoS ONE 11(10): e0163493. doi:10.1371/journal.pone.0163493

Anexo 2 -Quantitative muscle MRI to follow-up late onset Pompe patients: a prospective study; Dr. Sebastian Figueroa-Bonaparte, Dr. Jaume Llauger, Ms. Sonia Segovia, Miss Izaskun Belmonte, Miss Irene Pedrosa, Miss Elena Montiel, Miss Paula Montesinos, Mr. Javier Sánchez-González, Dr. Alicia Alonso-Jimenez, Dr. Eduard Gallardo, Dr. Isabel Illa, Dr. Jordi Díaz Manera; Scientific Reports; SREP-18-03397B; aprobado el 03/07/2018

Financiamiento – Este trabajo fue elaborado con una subvención de Genzyme a JDM (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01914536?term=pompe+disease&rank=13>) y una subvención del Ministerio de Salud de España, FISS PI15/01822 a JDM. Los patrocinadores no han tenido rol en el diseño del estudio, recolección de la data y análisis, decisión de publicar, o preparación del manuscrito.

RESEARCH ARTICLE

# Muscle MRI Findings in Childhood/Adult Onset Pompe Disease Correlate with Muscle Function

Sebastián Figueroa-Bonaparte<sup>1,2</sup>, Sonia Segovia<sup>1,2</sup>, Jaume Llauger<sup>3</sup>, Izaskun Belmonte<sup>4</sup>, Irene Pedrosa<sup>4</sup>, Aina Alejaldre<sup>1,2</sup>, Mercè Mayos<sup>5</sup>, Guillermo Suárez-Cuartán<sup>5</sup>, Eduard Gallardo<sup>1,2</sup>, Isabel Illa<sup>1,2</sup>, Jordi Díaz-Manera<sup>1,2\*</sup>, Spanish Pompe Study Group<sup>¶</sup>

**1** Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, **2** Centro de Investigación en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), **3** Radiology department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, **4** Rehabilitation and physiotherapy department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, **5** Respiratory diseases department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

¶ Membership of the Spanish Pompe Study Group is provided in the Acknowledgments.

\* [jdiazm@santpau.cat](mailto:jdiazm@santpau.cat)



OPEN ACCESS

**Citation:** Figueroa-Bonaparte S, Segovia S, Llauger J, Belmonte I, Pedrosa I, Alejaldre A, et al. (2016) Muscle MRI Findings in Childhood/Adult Onset Pompe Disease Correlate with Muscle Function. PLoS ONE 11(10): e0163493. doi:10.1371/journal.pone.0163493

**Editor:** Maurilio Sampaolesi, Katholieke Universiteit Leuven, BELGIUM

**Received:** April 5, 2016

**Accepted:** September 9, 2016

**Published:** October 6, 2016

**Copyright:** © 2016 Figueroa-Bonaparte et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Data contain identifying information and are unsuitable for public sharing. Data may be requested from the corresponding author.

**Funding:** This work was supported by a grant from Genzyme to JDM (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01914536?term=pompe+disease&rank=13>) and a grant from the Spanish Ministry of Health, FISS PI15/01822 to JDM. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

### Objectives

Enzyme replacement therapy has shown to be effective for childhood/adult onset Pompe disease (AOPD). The discovery of biomarkers useful for monitoring disease progression is one of the priority research topics in Pompe disease. Muscle MRI could be one possible test but the correlation between muscle MRI and muscle strength and function has been only partially addressed so far.

### Methods

We studied 34 AOPD patients using functional scales (Manual Research Council scale, hand held myometry, 6 minutes walking test, timed to up and go test, time to climb up and down 4 steps, time to walk 10 meters and Motor Function Measure 20 Scale), respiratory tests (Forced Vital Capacity seated and lying, Maximum Inspiratory Pressure and Maximum Expiratory Pressure), daily live activities scales (Activlim) and quality of life scales (Short Form-36 and Individualized Neuromuscular Quality of Life questionnaire). We performed a whole body muscle MRI using T1w and 3-point Dixon imaging centered on thighs and lower trunk region.

### Results

T1w whole body muscle MRI showed a homogeneous pattern of muscle involvement that could also be found in pre-symptomatic individuals. We found a strong correlation between muscle strength, muscle functional scales and the degree of muscle fatty replacement in muscle MRI analyzed using T1w and 3-point Dixon imaging studies. Moreover, muscle MRI detected mild degree of fatty replacement in paraspinal muscles in pre-symptomatic patients.



**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Conclusion

Based on our findings, we consider that muscle MRI correlates with muscle function in patients with AOPD and could be useful for diagnosis and follow-up in pre-symptomatic and symptomatic patients under treatment.

## Take home message

Muscle MRI correlates with muscle function in patients with AOPD and could be useful to follow-up patients in daily clinic.

## Introduction

Childhood/adult onset Pompe disease (AOPD) is a genetic disorder caused by mutations in the *GAA* gene leading to a deficiency of the enzyme acid  $\alpha$ -glucosidase[1]. This enzyme degrades glycogen inside the lysosomes. Glycogen accumulates in skeletal muscles of AOPD patients leading to a number of pathologic changes producing muscle weakness[2]. AOPD patients may have different clinical presentations, such as asymptomatic hyperCKemia, slowly progressive limb girdle weakness and respiratory insufficiency secondary to respiratory muscle weakness[3].

Enzyme replacement therapy with alfa-glucosidase (ERT) has changed the natural history of AOPD[4]. Published studies show that ERT improves muscle function during the first months of treatment and stabilizes clinical situation over time[5–7]. One of the main drawbacks of this treatment is the high cost of the drug per patient and year (more than 250.000\$/year). Considering that the drug stabilizes function but lifelong treatment is needed, health authorities have expressed concern regarding how to measure the effectiveness of treatment and when therapy should be started[8]. Clinical guides suggest that muscle MRI could be useful to follow progression of the disease in treated patients or to monitor signs of muscle deterioration in patients with asymptomatic hyperCKemia, anticipating the onset of their treatment[9–11].

Muscle MRI is a useful tool to study the structure of skeletal muscles. There are several sequences that analyzes different aspects of muscle [12]. T1-weighted (T1w) and 3-point Dixon imaging provide information on fat infiltration in muscle[13, 14]. T1w imaging has been used to identify patterns of muscle fatty infiltration helpful for the diagnosis of muscles diseases[15, 16]. Recent studies have pointed out the utility of 3-point Dixon sequences to quantify the percentage of fatty infiltration in muscles and follow-up patients over a period of time[17, 18]. However it is not yet known whether the degree of muscle fatty infiltration correlates with muscle strength and function in AOPD patients. This question needs to be addressed prior to consider muscle MRI as a surrogate biomarker of disease progression, especially at present, when ERT has changed the natural history of the disease. To tackle this question, we performed a transversal observational study in a large group of AOPD patients comparing muscle function tests with results of T1w and 3-Point Dixon muscle imaging.

## Material and Methods

### Clinical assessment

We are currently conducting a prospective observational study following-up a cohort of 34 genetically confirmed AOPD patients at the Hospital of Sant Pau. This study is registered in the webpage ClinicalTrials.gov with the identifier NCT01914536. All patients provided written informed consent to participate in the study. The study was reviewed and approved by the Ethics Committee at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

We collected data concerning epidemiological characteristics, general medical background and current clinical status at basal visit. Two physiotherapists evaluated muscle function using the following tests: 6-minutes walking test (6MWT), time to walk 10 meters, time to up-and-go, time to climb up and down 4 steps, and motor function measure-20 items scale (MFM-20). Daily living activities were studied using Activlim test and quality of life was investigated using INQoL and SF-36 questionnaires.

Muscle strength was studied using both Muscle Research Council scale (MRC) and hand-held myometry. Using MRC, which grades muscle strength from 0 (no movement) to 5 (normal strength), we evaluated neck flexion and extension, arm abduction, elbow flexion and extension, finger flexion and extension, hip flexion, extension, adduction and abduction, knee flexion and extension, and foot flexion, extension, inversion, and eversion. Trunk flexion and extension functions, which are not commonly studied using MRC, were analyzed as follows: normal movement: 5 points, ineffective muscle contraction: 3 points, no muscle contraction: 0 points. We defined a MRC total score as the aggregate of MRC scores of every single function analyzed.

Using hand-held myometry we evaluated the following muscle functions: neck flexion, arm abduction, elbow flexion and extension, hip flexion, extension, adduction, and abduction, knee flexion and extension. These studies were performed only on patient's dominant side. A myometry score was defined as the aggregate of scores obtained with the myometer.

We obtained forced vital capacity seated (sFVC), forced vital capacity in a lying position (IFVC), maximum inspiratory pressure (MIP) and maximum expiratory pressure (MEP) using a conventional spirometry. We performed a blood analysis to all patients to test CK levels before physiotherapy assessment. The normal values of CK in our laboratory are less than 174 U/L.

## Muscle MRI

Whole body muscle MRI was performed in a Philips Achieva XR 1.5 Teslas device at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Axial T1 weighted turbo spin echo images were obtained using the following acquisition parameters TR = 757 ms, TE = 17 ms, thickness = 8 mm, number of slices = 164, FOV = 530 x 530 mm, acquired voxel size = 1.6 x 2.88 mm. 3-point Dixon images were acquired in 3D with the following acquisition parameters: TR/TE = 5.78/1.8, 4 ms, flip angle = 15 degrees, FOV = 520 x 340 x 300 mm, voxel size = 1 x 1 x 3 mm of both thighs and FOV = 520 x 320 x 200 mm and voxel size = 1.3 x 1.7 x 5 mm for the lower trunk. Water and fat images were automatically obtained from the Dixon acquisition. The time to obtain all the images was 45 minutes per patient.

Two observers (J.D. and J.L.) quantified fatty muscle infiltration in T1w imaging using the modified version of the Mercuri score published by the group of Dr. Fischer [19]:

- *Normal muscle appearance*: 0 points
- *Mild*: traces of increased signal intensity on the T1-weighted MR sequences: 1 point
- *Moderate*: increased T1-weighted signal intensity with beginning confluence in less than 50% of the muscle: 2 points
- *Severe*: increased T1-weighted signal intensity with beginning confluence in more than 50% of the muscle: 3 points
- *End-stage appearance*: entire muscle replaced by increased density of connective tissue and fat: 4 points

Each muscle was evaluated at both sides. A complete list of the muscles analyzed can be found in [S1 Materials](#). We generated a muscle MRI score that was calculated adding all the

values obtained from the muscles analyzed. Its value ranged from 0 (lowest value, all muscles are scored as 0) to 290 (highest value, all muscles are scored as 4).

To analyze 3-point Dixon images we chose five cross-sectional Dixon slices of thighs and lower trunk, in which muscle volume was highest. A complete list of the muscles analyzed can be found in [S1 Materials](#). We mapped full cross-section of muscle groups or individual muscles and the fat fractional data were generated.

A single observer (S.F-B) estimated fat content in the muscles using the PRIDE platform (Philips Research Image Development Environment) which enables analysis of Dixon images. In order to calculate the fat fraction, a ROI (Region of Interest) was drawn in both the fat and water images. Fat fraction coefficient was defined as  $\text{fat}/(\text{fat}+\text{water})$  where fat and water are the image intensity values over the ROI for the water and fat images respectively.

## Statistics

We used Shapiro-Wilk test to confirm that none of our measured variables were normally distributed and we used non-parametric statistic tests for the analysis.

Mann-Whitney U test was used to compare quantitative variables and Chi-square test to compare qualitative variables. To investigate whether there was a correlation between the muscle function scales and MRI findings we used Spearman's rank correlation (coefficient reported as  $r$ ). We considered the correlation was good if  $P$  was lower than 0.05 and  $r$  was 0.65 or higher. Hierarchical analysis and graphical representation as a heatmap was performed using R software version 3.1.3 as previously described[20]. Statistical studies were performed using SPSS<sup>®</sup> Statistics software version 21 from IBM<sup>®</sup>. All data acquired from the visits and analysis of the MRIs can be found in the Supplemental Study Data Section.

## Results

### Clinical description of the cohort

We included 34 patients with a diagnosis of AOPD ([Table 1](#)). Seven patients were considered asymptomatic as they had only hyperCKemia, without any clinical symptom of muscle weakness, while 27 patients were considered symptomatic as they had muscle weakness. HyperCKemia patients were younger than symptomatic ones (21.4 y.o. vs 50.18 y.o, Mann-Whitney U test,  $p < 0.001$ ) ([Table 2](#)).

The most common clinical complaint was muscle weakness involving lower limbs. Only 20% of patients had problems raising their arms. Twelve patients used aids for walking such as cane or stick, while two patients were wheelchair bound. Exertion dyspnea was present in 60% of patients and orthopnea was present in 28%. Thirteen of 27 symptomatic patients (48.1%) were on respiratory support; which was non-invasive and nocturnal in 12 patients and invasive in 1 patient.

Twenty-two of the 27 symptomatic patients were treated with ERT, while none of the hyperCKemia patients were under ERT. The mean age at which ERT was started was 45.7 +/- 9 years old. The mean time on ERT when the tests were performed was 4.4 +/- 1.03 years.

### Analysis of muscle function

The MRC scale detected muscle weakness in all symptomatic patients. Hierarchical clustering analysis of the MRC scale scores showed that paraspinal, abdominal and proximal muscles of lower limbs were the weakest muscles ([Fig 1](#)). In general, hip extension was weaker than hip flexion and thigh adduction was weaker than thigh abduction. Mean muscle MRC score was 161.5 points (range 124–180). MRC score had a poor correlation with age at the time of the

**Table 1. List of patients participating in the study.**

N	Gender	Age at Study (y)	Phenotype	GAA gene		CK (U/l)	ERT	Age at ERT (y)	Wheelchair dependent	Ventilation
				Mut 1	Mut 2					
1	F	50	Proximal weakness LL + axial	IVS1-13T>G	c.1076-1G>C	251	Yes	47	N	N
2	F	48	Proximal weakness UL and LL + axial + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G IVS1-13T>G	c.2173C>T	779	Yes	39	Y	Y
3	F	26	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	779	No	-	N	N
4	F	63	Proximal weakness LL + axial	IVS1-13T>G	c.2600_2604delinsA	311	Yes	59	N	N
5	M	11	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.573C>A	276	No	-	N	N
6	F	45	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1532C>A	322	Yes	42	N	N
7	F	51	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.236_246del	240	Yes	47	N	N
8	M	66	Axial + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.1933G>T	406	No	-	N	N
9	F	59	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1637A>G	341	Yes	52	N	N
10	F	55	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.2173C>T	359	Yes	48	N	N
11	M	42	Proximal weakness LL + axial + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.573C>A	606	Yes	39	N	Y
12	F	31	Proximal weakness UL and LL + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.1637A>G	391	Yes	24	Y	Y
13	F	46	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	C.1192dupC	396	Yes	39	N	N
14	M	47	Proximal weakness LL + respiratory insuf@ciency	c.2173C>T	c.2173C>T	508	Yes	45	N	Y
15	M	51	Proximal weakness LL + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.1657C>T	709	Yes	45	N	Y
16	F	51	Proximal weakness UL and LL + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.1657C>T	458	Yes	46	N	Y
17	M	22	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1781G>A	1268	No	-	N	N
18	M	49	HyperCKemia	c.271G>A	c.2510G>A	641	No	-	N	N
19	M	14	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.573C>A	660	No	-	N	N
20	F	65	Proximal weakness LL + respiratory insuf@ciency	c.1781G>A	c.1194+5G>A	68	Yes	64	N	N
21	F	35	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1A>T	355	Yes	29	N	N
22	F	40	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	831	No	-	N	Y
23	F	52	Proximal weakness LL + respiratory insuf@ciency	c.1781G>A	c.1194+5G>A	907	Yes	45	N	N
24	M	64	Proximal weakness UL + LL + axial + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.2481+102_2646+31del	430	Yes	57	N	Y
25	M	8	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	1077	No	-	N	N
26	F	57	Proximal weakness LL + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.1447G>T	394	Yes	55	N	Y
27	M	46	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1532 C>A	882	Yes	43	N	Y
28	M	51	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1933G>T	952	Yes	51	N	Y
29	M	51	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1933G>T	432	No	-	N	Y
30	M	43	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1408_1410delinsTTT	317	Yes	43	N	N
31	F	54	Axial	*Not found	*Not found	275	Yes	48	N	N
32	M	42	Proximal weakness UL + LL	IVS1-13T>G	c.655G>A	886	No	-	N	N
33	F	20	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1551+1G>A	928	No	-	N	N

(Continued)

Table 1. (Continued)

N	Gender	Age at Study (y)	Phenotype	GAA gene		CK (U/l)	ERT	Age at ERT (y)	Wheelchair dependent	Ventilation
				Mut 1	Mut 2					
34	M	50	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1637A>G	492	No	-	N	Y

Patient 31: Diagnosis was confirmed by enzymatic quantitation in muscle biopsy and peripheral blood lymphocytes. No mutation was found in the GAA gene. F, female. M, male

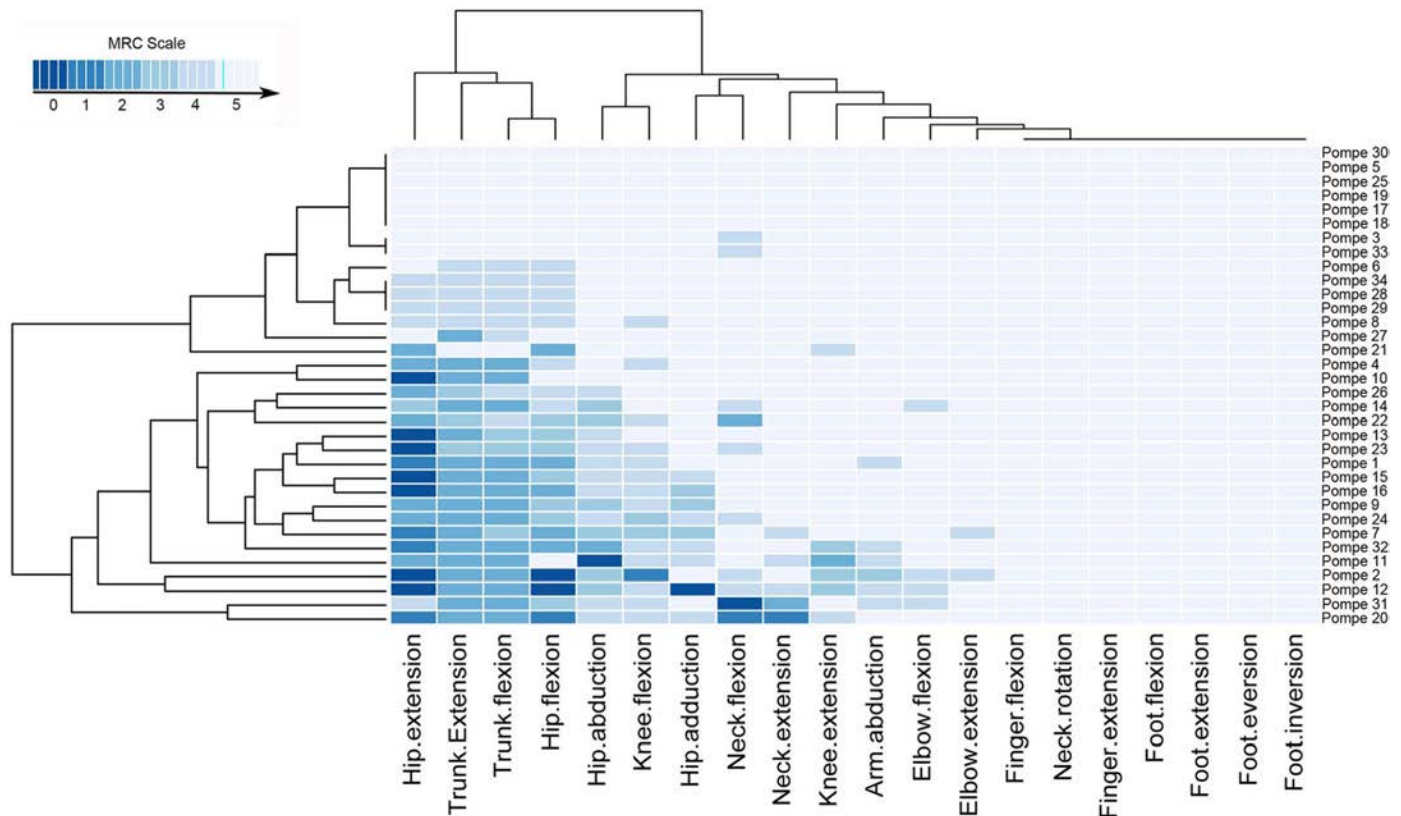
doi:10.1371/journal.pone.0163493.t001

study (Spearman test,  $p=0.015$ ;  $r = -0.414$ ), with time from onset of the symptoms (Spearman test,  $p=0.018$ ;  $r = -0.404$ ) and with gender (Spearman test,  $p = 0.009$ ,  $r: 0.441$ ) and did not correlate with delay in the start of ERT (Table 3). In contrast, MRC score had a good correlation with the results of most of muscle function tests used in clinical trials such as 6MWT or the time to climb up and down four stairs, and also with scales measuring daily live activities (Activlim) or muscle function (MFM-20). Correlation between MRC score and Quality of life scales was statistically significant, but correlation coefficient was poor. We also measured strength using hand-held myometry. The mean myometry score was 196.3 points (range 55–

Table 2. Demographic, clinical and radiologic features of hyperCKemia and symptomatic Pompe patients.

	HyperCKemia (N = 7)	Symptomatic (n = 27)	Statistical significance
Demographic characteristics			
Age at study (y)	21.4 (+/-15.5)	50.1 (+/-8.9)	<0.001
Gender female	2/7 (28.6%)	16/27 (59.3%)	0.124*
Delay in diagnosis (y)	6.1(+/- 5.1)	9 (+/- 7)	0.367
Time of progression (y)	NA	15.5	NA
Strength and functional scales			
Total MRC score	119.5 (0.7)	96 (15.5)	<0.001
Myometry score (Nm)	288.28 (137.3)	196.63 (136.1)	0.143
Time to walk 10 meters (sec)	3.22 (0.5)	7.40 (3.7)	0.006
6 minutes walking test (meters)	594 (75.6)	403.5 (147.1)	0.003
Time climb up 4 steps (sec)	1.5 (0.2)	4.7 (3.4)	0.002
Time go down 4 steps (sec)	1.4 (0.2)	3.7 (2.5)	0.022
Time to up&go (sec)	3.8 (1.5)	9.4 (8.5)	0.140
Daily live activities and quality of live scales			
Activlim	36 (6.3)	29.3 (5.9)	0.003
SF-36 (%)			0.002
INQuol	14.4	110.6	<0.001
Laboratory, respiratory and cardiac assessments			
CVF seated (%)	95.7(12.2)	75.7(22.6)	0.049
CVF lying (%)	82.3 (12.5)	64.4(27)	0.240
CPKs (U/l)	911.5 (260.9)	523.8(236.6)	0.008
Muscle MRI-T1w imaging			
Total muscle MRI Score	6 (6.8)	125.9 (46.7)	<0.001
Muscle MRI head/arms	2.1	25.3	<0.001
Muscle MRI trunk	4.9	13.7	<0.001
Muscle MRI legs	0.5	74.3	<0.001
Muscle MRI-3 point Dixon imaging			
Thighs fat fraction (%)	11.73	38.17	<0.0001
Paraspinal muscles fat fraction (%)	18.79	65.07	<0.0001

doi:10.1371/journal.pone.0163493.t002



**Fig 1. Distribution of muscle weakness in the cohort of AOPD participating in the study.** The heatmap showed the MRC value for all muscles studied. Hip extension and flexion and trunk extension and flexion were the most weak impaired movements of the patients. In contrast, we did not observe distal weakness involving the lower or the upper limbs.

doi:10.1371/journal.pone.0163493.g001

570). There was a good correlation between the total MRC score and the Myometry score (Spearman test,  $p = 0.001$ ;  $r = 0.667$ ). Myometry score correlated well with muscle function tests, but this correlation coefficient was lower than correlation coefficient obtained with MRC score (Table 3).

### Muscle MRI analysis: T1w imaging and pattern description

We performed a hierarchical clustering analysis of values obtained from the quantification of T1w muscle MRI and visualized these data using heatmaps (Fig 2). Our analysis showed pre-dominant involvement of paraspinal muscles, abdominal muscles, tongue, *subscapularis* and

*latissimus dorsi* in head and trunk. Head muscles (except tongue), upper limbs and periscapular muscles (except *subscapularis*) were not generally involved. In lower limbs, *glutei* muscles, *psaos*, *iliacus* and posterior muscles of the thighs (*semitendinosus*, *semimembranosus*, *adductor major* and *longus*, and both heads of *biceps*) were predominantly involved. *Glutei minor* and *medius* were more involved than *glutei maximus*. *Vastus intermedius* was the most commonly involved quadriceps muscle, while *rectus femoris* was rarely involved. In contrast, *sartorius* and *gracillis* muscles and lower legs muscles were commonly spared (Fig 2). We show some examples of muscle involvement in Fig 3.

We observed subtle changes in 4 of the 7 pre-symptomatic patients (Fig 2). Mild fatty infiltration (score = 1) was observed in paraspinal muscles (*multifidus*, *longissimus*, *iliocostalis*),

**Table 3. Correlation between MRC Score, Myometry Score, demographic data and muscle function tests.**

	MRC Score		Myometry Score	
	Spearman test	Correlation coefficient	Spearman test	Correlation coefficient
Demographic data				
Gender	0.009	0.441	0.01	0.553
Age at MRI	0.015	-0.414	0.049	-0.351
Time from onset of symptoms	0.018	-0.404	0.012	-0.437
Delay from onset to ERT	0.158		0.384	
Functional tests				
Time to walk 10 meters	0.0001	0.803	0.0001	0.722
6MWT	0.0001	0.708	0.0001	0.642
Time to up&go	0.083	-0.322	0.487	-0.132
Time to climb up 4 stairs	0.0001	-0.810	0.0001	-0.630
Time to go down 4 stairs	0.0001	-0.770	0.0001	-0.664
MFM-20	0.0001	0.803	0.0001	0.722
Daily live activities and Quality of life scales				
Activlim	0.0001	0.860	0.0001	0.726
SF-36	0.017	0.448	0.002	0.579
INQoL	0.001	-0.587	0.001	-0.633
Respiratory tests				
CVF seated	0.012	0.454	0.469	0.140
CVF lying	0.05	0.498	0.666	0.121
MIP	0.246	-0.308	0.254	-0.314
MEP	0.149	-0.392	0.670	0.125

Table 3 shows correlation between MRC Score and myometry score with demographic data, muscle function tests and daily live activities.

doi:10.1371/journal.pone.0163493.t003

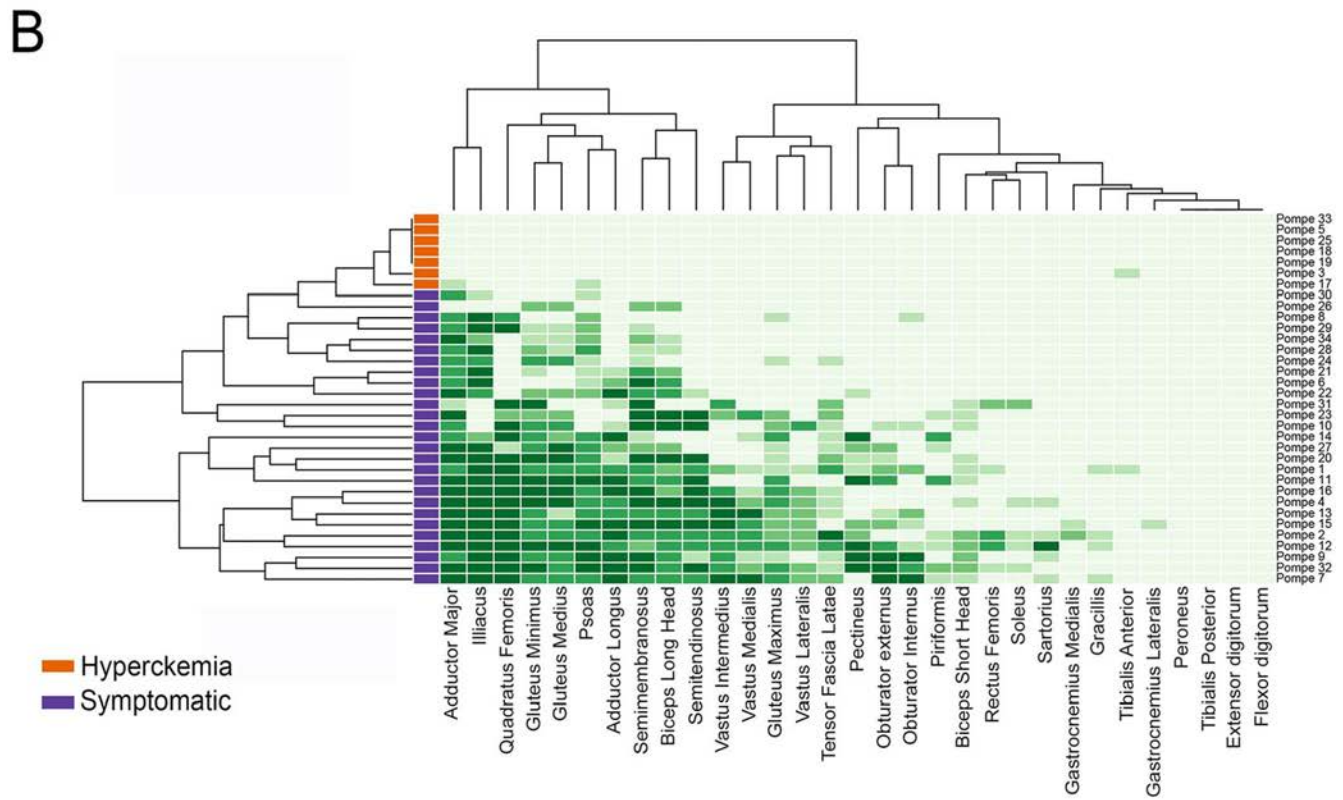
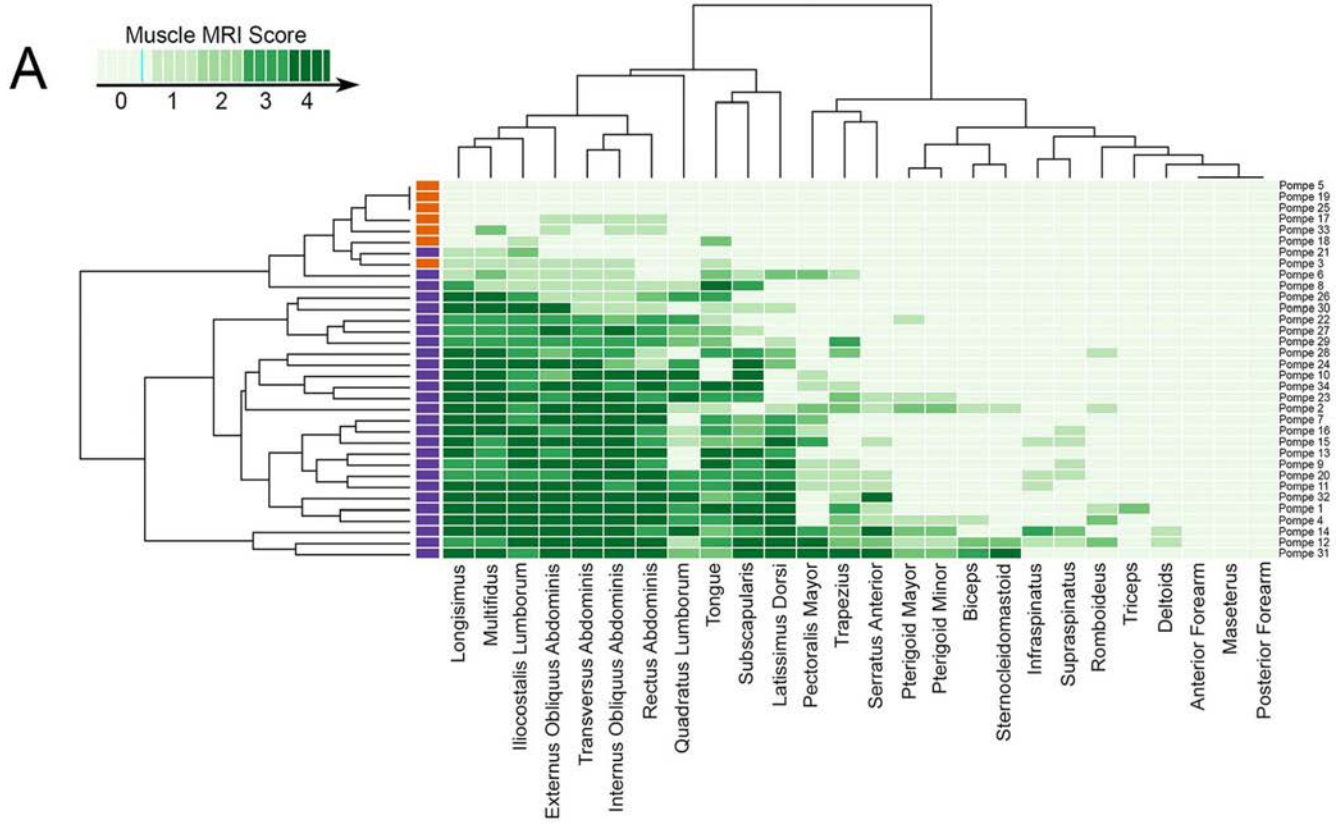
abdominal muscles (*rectus abdominis*, *obliquus internus*, *obliquus externus*, *transversus abdominalis*), tongue, and *adductor major* muscles.

### Muscle MRI analysis: 3-point Dixon imaging.

We analyzed twelve muscles of the thighs and four muscles of the trunk. Fig 4A summarizes the results, showing significant differences in fatty infiltration of muscles between symptomatic and hyperCKemia patients (Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ). S1 Fig shows an example of a 3-point Dixon analysis of thighs. The degree of muscle involvement in symptomatic patients varied from severe, as in *Adductor Major* (median fat fraction 78.05%) to mild involvement as in *Rectus femoris* (median fat fraction 13.46%) (S1 Table). Fatty substitution of paraspinal muscles (*multifidus*, *longissimus* and *iliocostalis*) was very high in symptomatic patients, reaching more than 80% in 19/27 symptomatic patients, and was also detectable in hyperCKemia patients (median fat fraction of 22.26%). There was a strong correlation between Mercuri scores detected using T1w imaging and fat fraction analyzed using 3-point Dixon images (Fig 4D).

### Correlation between muscle function tests and muscle MRI

Correlations between myometry measures and fat infiltration in appropriately tested muscles were similar for 3-point Dixon and for T1w imaging (S2 Table). For example, correlation between knee flexion strength and “hamstring average fat fraction” (the average of fatty



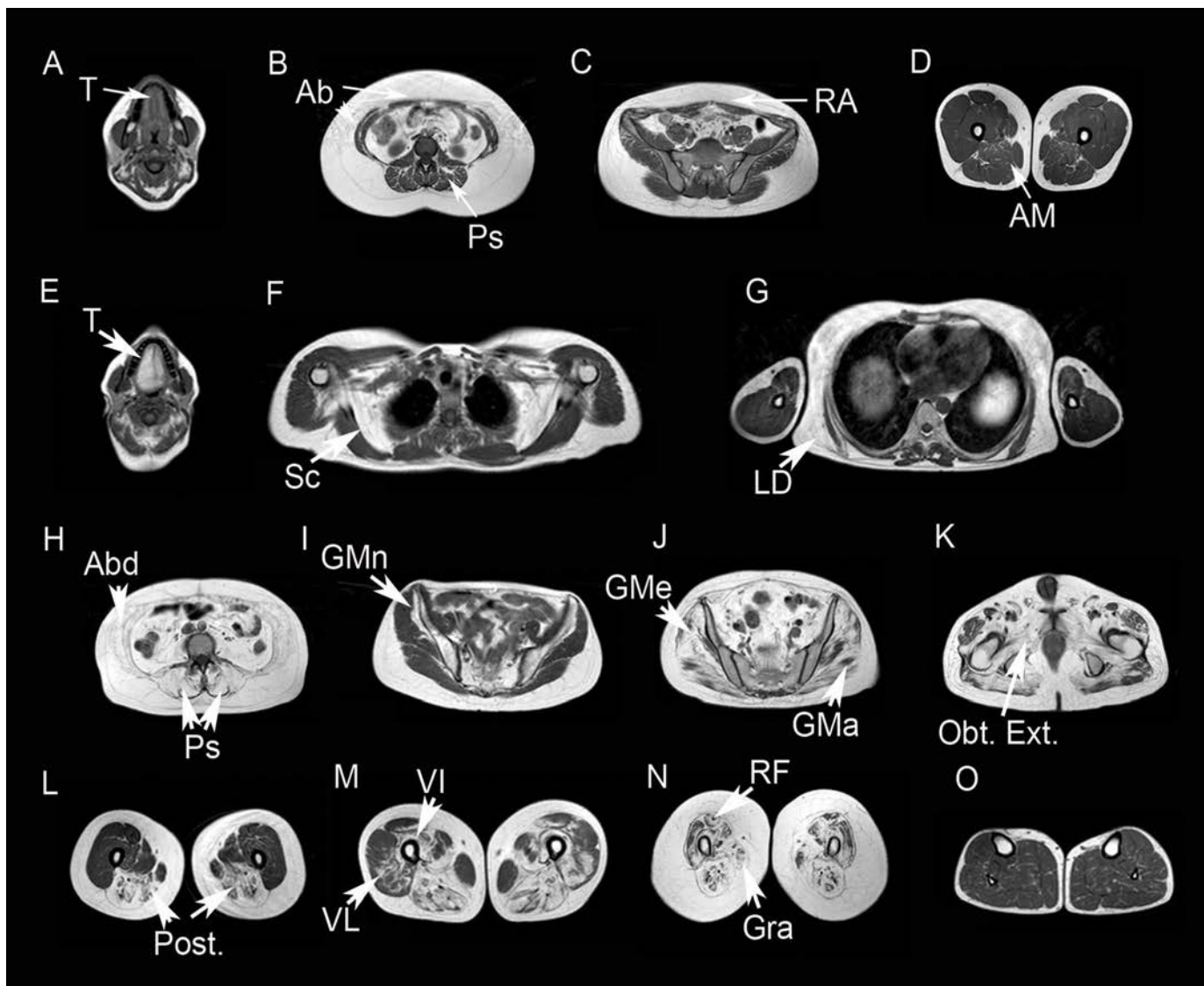


**Fig 2. Representation of score of muscle infiltration observed in T1 imaging in each muscle of every patient by heatmaps.** (A) Heatmap including muscles of the head, upper limbs and trunk. (B) Heatmap including muscles of the pelvis and lower limbs. In each heatmap, patients (rows) are ordered according to hierarchical clustering with increasing grading in infiltration severity from the top to the bottom. Muscles (columns) are ordered according to dendrogram (upper part of the figures). The score of a muscle in a patient is indicated by the colour of the square in the interaction between the patient and that muscle. The darker the square, the more intense the fatty infiltration of that muscle is.

doi:10.1371/journal.pone.0163493.g002

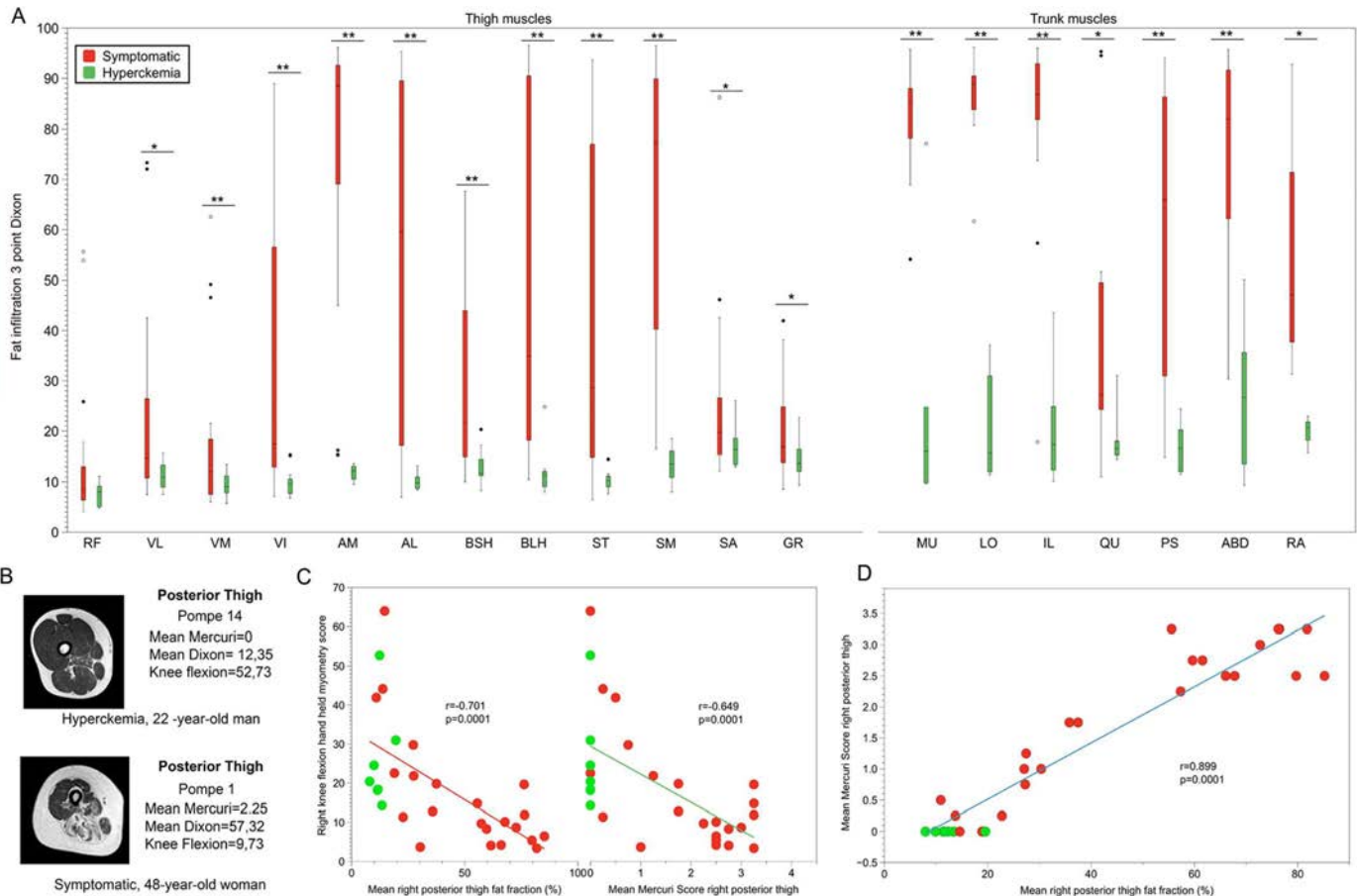
infiltration in *semimembranosus*, *semitendinosus*, *biceps long* and *short head* muscles) for 3-point Dixon imaging was  $\rho = -0.70$ , while for T1w imaging, was  $r = -0.649$  (Fig 4D).

We developed a muscle MRI-T1w score that was the sum of values of the Mercuri scale for each muscle. The mean MRI score was 6 (range: 0 to 15 points) in hyperCKemia patients and



**Fig 3. T1w Muscle MRI of patients with Pompe disease.** We observed mild fatty infiltration in muscles of hyperCKemia patients: Tongue (Tin A), paraspinal muscles (Ps in B), lateral abdominal muscles (Ab in B) and *rectus abdominis* (RA in C) and in *adductor major* muscles (AM in D). The fatty infiltration in symptomatic patients was more evident (E-L). The muscles more commonly involved were tongue (T in E), *subscapularis* (Sc in F), *latissimus dorsi* (LD in G), the abdominal (Ab in H) and paraspinal muscles (Ps in H), the *Gluteus minor* (GMn in I), *medius* (GMe in J) and *maximus* (GMa in J), the muscles of the pelvic floor such as the *Externus Obturator* (Obt. Ext. in K), the posterior muscles of the thighs (Post in L), and the vasti muscles including *vastus intermedius* (VI in M) and *vastus lateralis* (VL in M). We observed involvement of *rectus femoris* and *gracilis* in advanced patients (RF and Gra in N). Muscles of the lower legs were commonly spared (O).

doi:10.1371/journal.pone.0163493.g003



**Fig 4. Analysis of fatty infiltration in muscle MRIs.** (A) We observed significant differences in the percentage of fatty infiltration quantified using 3-point Dixon technique in most of the muscles between symptomatic (red bars) and hyperckemia patients (green bars). We compared both groups using the Student T test (single asterisk for differences with  $p < 0.05$  and double asterisk for differences with  $p < 0.01$ ). (B) Fat-fraction maps of the right thigh in a hyperckemia and a symptomatic AOPD patient. We show the quantification of the fatty involvement of posterior muscles of the thighs using the mean Mercuri Score and the mean 3 point Dixon score (*Semitendinosus*, *Semimembranosus*, *Biceps Long Head* and *Biceps Short Head*). Pompe 14 patients (hyperckemia patient) had higher strength in knee flexion measured with the myometer than patient 1 (symptomatic patient). We observed predominant fatty infiltration in the posterior muscles of the thighs producing decreased strength in the knee flexion test. (C) There was a strong correlation between knee flexion strength and the degree of muscle fatty infiltration calculated both using 3-point Dixon (left) and the Mercuri scale (right). Green dots showed values of hyperckemia patients, while red ones represent values of symptomatic patients. (D) We found a strong correlation between 3 point Dixon analysis and Mercuri score. We have represented the correlation between the quantification of fat infiltration using the mean Mercuri score and the mean 3-point Dixon score of the posterior thigh muscles (*Semitendinosus*, *Semimembranosus*, *Biceps Long Head* and *Biceps Short Head*). RF: *rectus femoris*; VL: *vastus laterallis*; VM: *vastus medialis*; VI: *vastus intermedius*; AM: *adductor major*; AL: *adductor longus*; BSH: *biceps short head*; BLH: *biceps long head*; ST: *semitendinosus*; SM: *semimembranosus*; SA: *sartorius*; GR: *gracillis*; MU: *multifidus*; LO: *longissimus*; IL: *iliocostalis*; QU: *quadratus femoris*; PS: *psoas*; ABD: lateral abdominal muscles; RA: *rectus abdominis*.

doi:10.1371/journal.pone.0163493.g004

125.9 (range: 39 to 210 points) in symptomatic patients (Table 2). These differences reached statistical significance (Mann-Whitney U,  $p < 0.001$ ). We found strong correlation between muscle MRI-T1w score and most of the functional muscle tests, such as MRC score, 6MWT, MFM-20 or Activlim scale (Table 4). In contrast, we did not find a good correlation with respiratory tests results or quality of life scales (SF-36 and INQoL). Fig 5 shows 3 examples of correlation between Muscle MRI and functional tests.

We also found strong correlation between the average fat fraction of thigh measured using 3-point Dixon imaging and functional scales (Table 4). In most of the cases, correlation coefficients were higher for 3-point Dixon studies than for T1w imaging. For instance, the correlation coefficient between 6MWT (main test used in clinical trials) and 3-point Dixon tests was  $\rho$

**Table 4. Comparison among MRI score and 3-point Dixon correlations with demographic data and muscle function tests.**

	T1w-MRI Score		3-point Dixon (Average Thigh)	
	Spearman Test	Correlation coefficient	Spearman Test	Correlation coefficient
Demographic data				
Gender	0.069	-0.315	0.019	-0.456
Age at MRI	0.055	0.381	0.022	0.391
Time from onset of symptoms	0.257	0.231	0.043	0.349
Delay from onset to ERT	0.421	-0.224	0.498	-0.152
Functional tests				
Myometry Score	0.001	-0.560	0.0001	-0.633
6MWT	0.001	-0.610	0.0001	-0.764
Time to up&go	0.097	0.308	0.006	0.515
Time to climb up 4 stairs	0.0001	-0.782	0.0001	0.858
Time to go down 4 stairs	0.0001	-0.737	0.0001	0.810
MFM-20	0.0001	0.693	0.0001	-0.681
Daily live activities and Quality of life scales				
Activlim	0.0001	0.785	0.0001	-0.754
Respiratory tests				
FVC seated	0.035	-0.386	0.018	-0.469
FVC lying	0.08	-0.450	0.055	-0.544
PIM	0.356	0.247	0.40	0.253
PEM	0.541	-0.171	0.6	-0.16

doi:10.1371/journal.pone.0163493.t004

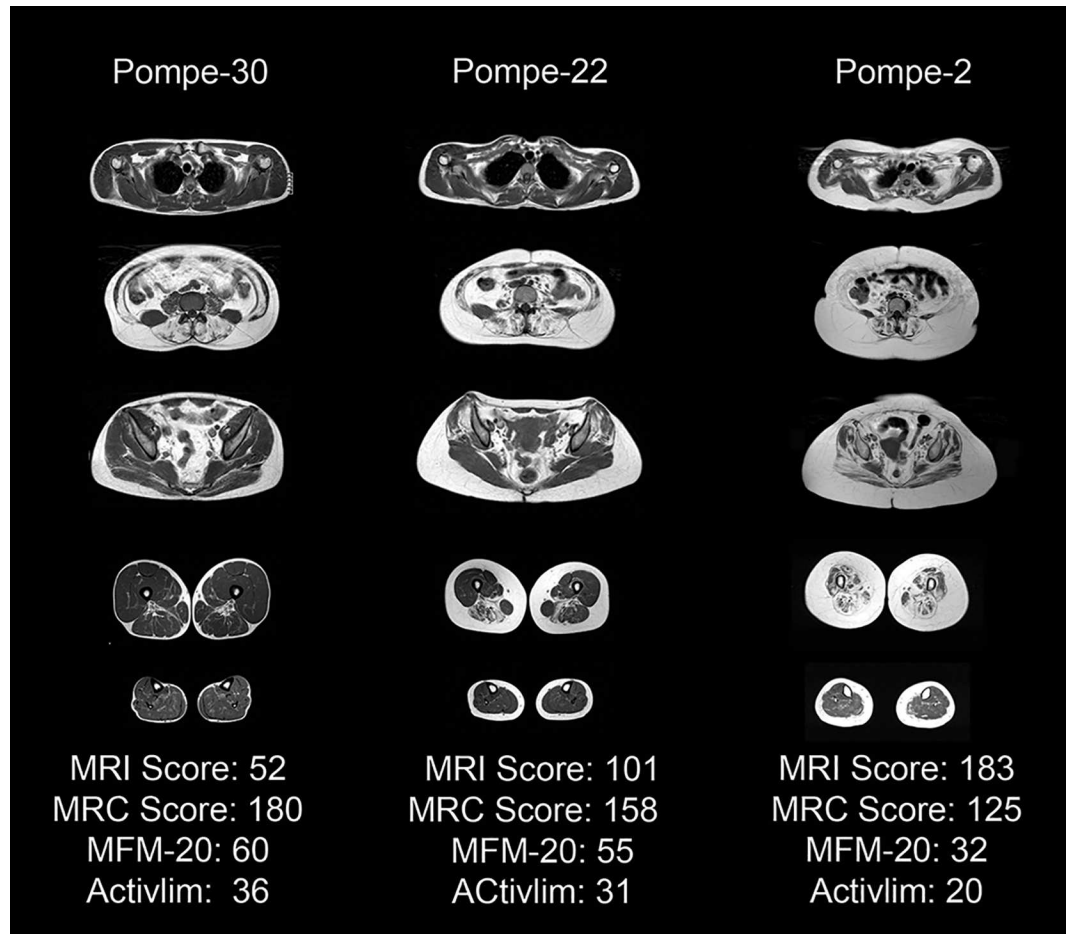
= -0.764 while it was lower for T1w imaging,  $r = -0.610$ . There was no correlation between 3-point Dixon studies and results of respiratory studies.

We analyzed the group of hyperCKemia patients in detail. We found mild changes in muscle MRI in four out of seven cases using T1w imaging that were statistically significant (Mann-Whitney U test,  $p = 0.008$ ). HyperCKemia patients with changes in MRI were older than 20 years old, whereas patients with no changes were younger than 15 years old. 3-point Dixon analysis showed statistically significant differences in the amount of muscle fatty infiltration of the paraspinal muscles in hyperCKemia patients older than 20 years when they were compared with patients younger than 15 years old (Table 5). In contrast, functional scales were similar in both groups.

## Discussion

In the present paper we demonstrate that muscle MRI is a useful tool for the study of patients with AOPD for several reasons. Muscle MRI efficiently identifies a group of atrophic muscles that corresponds to the weakest muscles in clinical examination. Muscle MRI has a good correlation with results of the functional muscle scales commonly used in clinical trials. Additionally, muscle MRI has sensitivity to detect early fat infiltration in patients with hyperCKemia before functional scales are impaired. Based on our results, muscle MRI is an acceptable tool to investigate muscle function status in patients with AOPD.

MRI imaging is progressively gaining widespread use to study patients with muscle diseases [14]. There are sequences available to study several aspects of muscle structure. Carlier et al showed the striking utility of using whole-body T1w imaging in a group of twenty AOPD patients, revealing bright signals as indicators of fat replacement in some specific muscles [21]. This technique facilitates pattern recognition when diagnosis is not clear [22]. However, quantification of fatty infiltration using T1w imaging is based usually in visual semiquantitative



**Fig 5. Correlation between Muscle MRI and Functional scales.** Patient 30 is a 43 years old man with mild infiltration of pelvic and lower limbs muscles with minor functional impairment. Patient 22 is a 40 years old lady with moderate involvement of trunk, pelvic and thighs muscles. She was able to perform most of her daily live activities with no major problems but her clinical examination showed moderate weakness of pelvic muscles. Patient 2 is a 48 years old lady with a severe involvement of muscle producing severe weakness and notably impairing her daily live activities.

doi:10.1371/journal.pone.0163493.g005

scales that are observer dependent. On the other hand, analysis of 3-point Dixon images is performed using software that quantifies the exact amount of fat per pixel. Thus, 3-point Dixon is more accurate than T1w imaging to detect slight changes in fatty infiltration. For this reason, 3-point Dixon could be potentially useful in clinical trials of patients with AOPD, in which fatty infiltration slowly progresses over time.

Nevertheless, to consider muscle MRI findings as a reliable outcome measure, it should also correlate with relevant patient function tests[23]. We show strong correlations between muscle MRI results and several functional scales commonly used in clinical trials such as MRC, time to walk 10 meters or the Activlim scale. We detected a significant correlation between muscle strength measured using hand held myometry and muscle fat fraction. Accordingly MRI provides evidence of muscle damage that correlate strongly with muscle strength and function that are independent of participant effort. This fact is especially important in patients with AOPD in whom 6 MWT has been used as the main functional test to analyze response to treatment. 6MWT is not only dependent on muscle strength, but is also influenced by many other factors such as dyspnea and muscle pain, therefore in our opinion, it analyzes general endurance. In

**Table 5. Comparison between presymptomatic patients with hyperckemia depending on the results of the MRI.**

	Normal MRI (n = 3)	Abnormal MRI (n = 4)	Mann-Whitney
Age (y)	11	29.2	0.073
MRC Score	180	179.2	0.243
Myometry Score (Nm)	261.24	308.49	0.695
6MWT (min)	616	577	0.572
Time to walk 10 meters (sec)	3.0	3.3	0.571
Time to climb up 4 stairs (sec)	1.4	1.5	0.677
Time to go down 4 stairs (sec)	1.3	1.5	0.455
Time to up&go (sec)	4.8	3.1	0.204
MFM-20	57.6	59.2	0.471
Activlim	36	36	1
T1w-MRI Score	0	10.5	0.008
3-point Dixon Fat fraction Thighs (%)	11.93	11.58	0.865
3-point Dixon Fat fraction Paraspinal muscles (%)	13.54	33.43	0.039

doi:10.1371/journal.pone.0163493.t005

fact, we have found a good correlation between muscle MRI and 6MWT. Moreover, the correlation between muscle MRI and muscle strength was strong. Muscle groups that were found atrophic in muscle MRI were the ones weak in MRC study. Heatmaps analyzing MRC (Fig 1) and muscle MRI are practically overlapping (Fig 2). Based on our results, muscle MRI offers a valid and consistent surrogate measure of muscle function. The group of Hovarth studied 7 Pompe patients and 11 controls, using whole-body proton-density fat-fraction imaging[24]. They reported a great sensitivity of MRI to detect subtle changes in skeletal muscles and a good correlation between muscle MRI results and muscle strength analyzed using MRC scale. Our study, which contains a larger number of patients, a more detailed physical examination, a comparison between quantitative and qualitative MRI sequences, and a shorter MRI protocol time (no more than 45 min), confirms their results.

Muscle MRI is also able to identify early changes in muscle signal of several neuromuscular disorders. We observed signs of muscle fatty infiltration in 4 out of 7 patients without any clinical symptom of muscle weakness. Clinical examination, functional and respiratory tests were all normal in these patients. In contrast, muscle MRI already revealed subtle changes, preferentially involving paraspinal and abdominal muscles, suggesting that the process of muscle degeneration had started. A recent retrospective study in a small cohort of AOPD patients analyzing muscle MRI of lower limbs in four asymptomatic patients showed a remarkable increase in fat infiltration of *Adductor magnus* muscle and mild changes in the remaining thigh muscles in one pre-symptomatic patient, suggesting that progressive fatty muscle infiltration starts before clinical manifestations[21]. However, the authors only used T1w imaging to determine mean gray values, which is not a quantitative technique. We have used 3-point Dixon sequences which calculate the exact percentage of fat in every muscle[25]. Moreover, we have analyzed muscle function in detail using several different tests demonstrating the lack of symptoms in patients with isolated hyperCKemia and therefore strengthening our results. In our opinion, detection of a progressive increase in the amount of fatty infiltration in skeletal muscles could potentially be taken into account before deciding to start ERT treatment in a patient with clinically asymptomatic AOPD. Although it is not know how much fatty infiltration in a single muscle is needed to produce weakness, it seems clear that the process of muscle fatty degeneration is not reversible once the treatment is started[26, 27]. Based on our results, it makes sense to follow-up AOPD patients with repeated muscle MRIs, especially those with asymptomatic hyperCKemia. Analysis of paraspinal and abdominal area is crucial to detect

changes and to determine whether fatty involvement of muscles progress[28]. We have already described the early involvement of paraspinal muscles in AOPD patients, which can sometimes present as a pure axial myopathy[28]. In this sense, 3-point Dixon imaging technique has emerged as a powerful tool, superior to T1w imaging, to detect subtle changes in percentage of muscle fatty infiltration in skeletal muscles[29]. Other quantitative sequences, such as quantitative T2-mapping, also showed a better profile than T1-weighted imaging to determine minimal changes in AOPD progression[30]. Although our aim was not to analyze disease progression, those results reinforce the need to improve our knowledge and use of new quantitative techniques.

In the last years several groups have started using quantitative MRI sequences to follow-up AOPD patients. However, these new quantitative techniques have some drawbacks: they are not available in many of the medical centers, they need specific software for quantification and the acquisition and analysis of the images consume a lot of time. In order to surpass these limitations, some authors have quantified fat tissue in skeletal muscles of T1w images using imaging software. For example, the group of Dr. Pichiechio followed-up 9 AOPD patients for six-months and the group of Dr. Kley analyzed muscle MRI of 7 AOPD using this technology[31, 32]. Although they were able to identify changes in fat tissue present in the muscles, it has reported than 3-point Dixon is more precise and reliable than T1w analysis for evaluation of fat fractions in longitudinal follow-up studies of patients with neuromuscular disorders[29]. We are currently conducting a prospective study of a large cohort of AOPD patients using 3-point Dixon as a tool in patient follow-up. We hope this new study will further support the usefulness of MRI for routine clinical practice.

In conclusion, muscle MRI is a reliable, valid and surrogate biomarker of muscle function in patients with AOPD. Muscle MRI is not only useful for diagnosis but also may be useful to predict muscle function in these patients. Furthermore, muscle MRI visualizes fatty muscle infiltration in asymptomatic Pompe patients before functional tests are impaired and potentially help to decide when ERT treatment should be started. Based on our observations, we consider muscle MRI could be used as a complementary test in clinical trials and in daily clinics of patients with AOPD.

## Supporting Information

**S1 Fig. Examples of Fat fraction estimation.** (A) Muscles of the thighs can be clearly identified in a single slice. (B) Selection of the region of interest (ROI) in the *vastus lateralis* muscle for the analysis of fat fraction that in this case is of 23.1%. (C) Paraspinal muscles can be identified in a single slice. (D) Selection of the region of interest (ROI) in the *multifidus* muscle for the analysis of fat fraction that in this case is of 21%.

(TIF)

**S1 Materials. Muscles studied using Fischer modified Mercuri Scale and 3 point Dixon.**

(DOC)

**S1 Table. Quantification of fatty muscle infiltration using 3-point Dixon imaging.** Quantification of fatty muscle infiltration in muscles of thighs and trunk in symptomatic AOPD patients and patients with hyperckemia only. Student T test was used to compare both groups of patients. P values lower than 0.05 were considered significant.

(DOCX)

**S2 Table. Comparison of the correlation between quantification of fatty involvement analyzed using T1 imaging and 3-point Dixon with muscle strength in appropriately tested muscles.** We correlated the strength of the thighs muscles with the degree of fatty infiltration in muscles analyzed using T1w and 3-point Dixon imaging. We correlated hip flexion with

fatty infiltration of psoas muscle, hip adduction with an average of fatty infiltration of *adductor longus* and major, knee extension with the average of fatty infiltration of *rectus femoris*, *vastus medialis*, *vastus intermedius* and *vastus lateralis*; and knee flexion with the average of fatty infiltration of *semitendinosus*, *semimembranosus*, *biceps long head* and *biceps short head*. (DOCX)

## Acknowledgments

We would like to thank the Spanish Association of Patients with Glycogenosis ([www.glucogenosis.org](http://www.glucogenosis.org)) for their support to our investigation. We thank Carolyn Newey for editorial support and Ignasi Gich for support with statistics. We thank Javier Sanchez González and Paula Montesinos Suarez de la Vega from Philips HealthCare Iberia and Dr. Antoni Capdevila for the technical support with the MRI. We thank the MRI whole technician team Esther Alemany, Nieves Campillos, Elisenda Mestres, Eugenia Torres, Ricard Cullell, Alberto Fernández and Mario González for their patience and support with the study. We thank Lidia Gonzalez Quereda, from the Genetic department of Sant Pau Hospital, for reviewing genetic studies of all patients. We also thank Mrs. Concepción Escolá for her assistance during the visits of the study. This study was supported with a grant by GENZYME and a Grant from the Spanish Ministry of Health, FISS PI15/01822 to Dr. Jordi Díaz Manera.

Coinvestigators—The Spanish Pompe Study Group:

Miguel Angel Barba-Romero MD (Hospital General de Albacete, Albacete, Spain)

Joseba Barcena MD (Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Spain)

Pilar Carbonell MD (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain)

María Rosario Carzorla MD (Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain)

Carlota Creus MD (Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain)

Jaume Coll-Cantí MD, PhD (Hospital Germans Tries i Pujol, Badalona, Spain)

Manuel Díaz MD (Hospital de Cabueñes, Gijón, Spain)

Cristina Domínguez MD (Hospital 12 de Octubre, Madrid & Instituto de Investigación i+12, Madrid, Spain)

Roberto Fernández Torrón MD (Hospital Universitario Donostia, Spain)

María José García Antelo MD (Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain)

Josep Maria Grau MD PhD (Hospital Clínic, Barcelona, Spain)

Adolfo López de Munáin MD PhD (Hospital Universitario Donostia, Spain)

Francisco Antonio Martínez-García MD (Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain)

Yolanda Morgado, MD (Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla, Spain)

Antonio Moreno MD (Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia, Spain)

Germán Morís, MD (Hospital Universitario de Asturias, Oviedo, Spain)

Miguel Angel Muñoz-Blanco MD (Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain)

Andres Nascimento MD (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain)

José Luis Parajuá Pozo MD (Hospital de Can Mises, Ibiza, Spain)

Arturo Robledo-Strauss MD (Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain)

Íñigo Rojas-Marcos MD (Hospital Virgen de Macarena, Sevilla, Spain)

Jose António Salazar MD (Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain)

Mercedes Usón MD (Hospital de Son Llátzer, Palma de Mallorca, Spain)

## Author Contributions

**Conceptualization:** SFB JL II JDM.

**Data curation:** SFB SS AA JDM.

**Formal analysis:** SFB SS IB IP AA MM GSC JDM.

**Funding acquisition:** II JDM.

**Investigation:** SFB SS IB IP AA MM GSC.

**Methodology:** SFB JL JDM.

**Project administration:** SS.

**Resources:** II JDM.

**Software:** SFB JL JDM.

**Supervision:** II EG JL JDM.

**Validation:** SFB EG II JDM.

**Visualization:** SFB JDM.

**Writing – original draft:** SFB EG II JL JDM.

**Writing – review & editing:** SFB EG SS II JL JDM.

## References

1. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet*. 2008; 372(9646):1342±53. doi: [10.1016/S0140-6736\(08\)61555-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61555-X) PMID: [18929906](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18929906/).
2. Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen E, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2006; 86(12):1208±20. doi: [10.1038/labinvest.3700484](https://doi.org/10.1038/labinvest.3700484) PMID: [17075580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17075580/).
3. Bembi B, Cerini E, Danesino C, Donati MA, Gasperini S, Morandi L, et al. Diagnosis of glycogenosis type II. *Neurology*. 2008; 71(23 Suppl 2):S4±11. doi: [10.1212/WNL.0b013e31818da91e](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31818da91e) PMID: [19047572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19047572/).
4. Gungor D, Kruijshaar ME, Plug I, Rizopoulos D, Kanters TA, Wens SC, et al. Quality of life and participation in daily life of adults with Pompe disease receiving enzyme replacement therapy: 10 years of international follow-up. *Journal of inherited metabolic disease*. 2015. doi: [10.1007/s10545-015-9889-6](https://doi.org/10.1007/s10545-015-9889-6) PMID: [26531313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26531313/).
5. van der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, Escolar DM, Florence J, Groeneveld GJ, et al. A randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease. *The New England journal of medicine*. 2010; 362(15):1396±406. doi: [10.1056/NEJMoa0909859](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909859) PMID: [20393176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20393176/).
6. van der Ploeg AT, Barohn R, Carlson L, Charrow J, Clemens PR, Hopkin RJ, et al. Open-label extension study following the Late-Onset Treatment Study (LOTS) of alglucosidase alfa. *Molecular genetics and metabolism*. 2012; 107(3):456±61. doi: [10.1016/j.ymgme.2012.09.015](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.09.015) PMID: [23031366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23031366/).
7. Toscano A, Schoser B. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: a systematic literature review. *Journal of neurology*. 2013; 260(4):951±9. doi: [10.1007/s00415-012-6636-x](https://doi.org/10.1007/s00415-012-6636-x) PMID: [22926164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22926164/).
8. Wyatt K, Henley W, Anderson L, Anderson R, Nikolaou V, Stein K, et al. The effectiveness and cost-effectiveness of enzyme and substrate replacement therapies: a longitudinal cohort study of people with lysosomal storage disorders. *Health technology assessment*. 2012; 16(39):1±543. doi: [10.3310/hta16390](https://doi.org/10.3310/hta16390) PMID: [23089251](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23089251/).
9. Barba-Romero MA, Barrot E, Bautista-Lorite J, Gutierrez-Rivas E, Illa I, Jimenez LM, et al. Clinical guidelines for late-onset Pompe disease. *Revista de neurologia*. 2012; 54(8):497±507. PMID: [22492103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22492103/).
10. Gutierrez-Rivas E, Illa I, Pascual-Pascual SI, Perez-Lopez J, Vilchez-Padilla JJ, Bautista-Lorite J, et al. [Guidelines for monitoring late-onset Pompe disease]. *Revista de neurologia*. 2015; 60(7):321±8. PMID: [25806482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25806482/).



11. Cupler EJ, Berger KI, Leshner RT, Wolfe GI, Han JJ, Barohn RJ, et al. Consensus treatment recommendations for late-onset Pompe disease. *Muscle & nerve*. 2012; 45(3):319±33. doi: [10.1002/mus.22329](https://doi.org/10.1002/mus.22329) PMID: [22173792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22173792/); PubMed Central PMCID: PMC3534745.
12. Mercuri E, Pichiecchio A, Allsop J, Messina S, Pane M, Muntoni F. Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: past, present, and future. *Journal of magnetic resonance imaging: JMIR*. 2007; 25(2):433±40. doi: [10.1002/jmri.20804](https://doi.org/10.1002/jmri.20804) PMID: [17260395](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17260395/).
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. doi: [10.1212/WNL.0b013e3181ea1564](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ea1564) PMID: [20574037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20574037/).
14. Hollingsworth KG. Quantitative MRI in muscular dystrophy: An indispensable trial endpoint? *Neurology*. 2014; 83(11):956±7. doi: [10.1212/WNL.0000000000000785](https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000785) PMID: [25098536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25098536/).
15. Straub V, Carlier PG, Mercuri E. TREAT-NMD workshop: pattern recognition in genetic muscle diseases using muscle MRI: 25±26 February 2011, Rome, Italy. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2012; 22 Suppl 2:S42±53. doi: [10.1016/j.nmd.2012.08.002](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.08.002) PMID: [22980768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22980768/).
16. Udd B. Distal myopathies—new genetic entities expand diagnostic challenge. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2012; 22(1):5±12. doi: [10.1016/j.nmd.2011.10.003](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.10.003) PMID: [22197426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22197426/).
17. Morrow JM, Sinclair CD, Fischmann A, Machado PM, Reilly MM, Yousry TA, et al. MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *The Lancet Neurology*. 2016; 15(1):65±77. doi: [10.1016/S1474-4422\(15\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00242-2) PMID: [26549782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26549782/); PubMed Central PMCID: PMC4672173.
18. Wary C, Azzabou N, Giraudeau C, Le Louer J, Montus M, Voit T, et al. Quantitative NMRI and NMRS identify augmented disease progression after loss of ambulation in forearms of boys with Duchenne muscular dystrophy. *NMR in biomedicine*. 2015; 28(9):1150±62. doi: [10.1002/nbm.3352](https://doi.org/10.1002/nbm.3352) PMID: [26215733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26215733/).
19. Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K, et al. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurology*. 2008; 71(10):758±65. doi: [10.1212/01.wnl.0000324927.28817.9b](https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000324927.28817.9b) PMID: [18765652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18765652/); PubMed Central PMCID: PMC2583436.
20. Diaz-Manera J, Alejandre A, Gonzalez L, Olive M, Gomez-Andres D, Muelas N, et al. Muscle imaging in muscle dystrophies produced by mutations in the EMD and LMNA genes. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2015. doi: [10.1016/j.nmd.2015.10.001](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.10.001) PMID: [26573435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26573435/).
21. Carlier RY, Laforet P, Wary C, Mompoin D, Laloui K, Pellegrini N, et al. Whole-body muscle MRI in 20 patients suffering from late onset Pompe disease: Involvement patterns. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2011; 21(11):791±9. doi: [10.1016/j.nmd.2011.06.748](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.06.748) PMID: [21803581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21803581/).
22. Diaz-Manera J, Llauger J, Gallardo E, Illa I. Muscle MRI in muscular dystrophies. *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*. 2015; 34(2±3):95±108. PMID: [27199536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27199536/); PubMed Central PMCID: PMC4859076.
23. Bonati U, Hafner P, Schadelin S, Schmid M, Naduvilekoot Devasia A, Schroeder J, et al. Quantitative muscle MRI: A powerful surrogate outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2015; 25(9):679±85. doi: [10.1016/j.nmd.2015.05.006](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.05.006) PMID: [26096788](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26096788/).
24. Horvath JJ, Austin SL, Case LE, Greene KB, Jones HN, Soher BJ, et al. Correlation between quantitative whole-body muscle magnetic resonance imaging and clinical muscle weakness in Pompe disease. *Muscle & nerve*. 2015; 51(5):722±30. doi: [10.1002/mus.24437](https://doi.org/10.1002/mus.24437) PMID: [25155446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25155446/).
25. Ma J. Dixon techniques for water and fat imaging. *Journal of magnetic resonance imaging: JMIR*. 2008; 28(3):543±58. doi: [10.1002/jmri.21492](https://doi.org/10.1002/jmri.21492) PMID: [18777528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18777528/).
26. Ravaglia S, Pichiecchio A, Ponzio M, Danesino C, Saeidi Garaghani K, Poloni GU, et al. Changes in skeletal muscle qualities during enzyme replacement therapy in late-onset type II glycogenosis: temporal and spatial pattern of mass vs. strength response. *Journal of inherited metabolic disease*. 2010; 33(6):737±45. doi: [10.1007/s10545-010-9204-5](https://doi.org/10.1007/s10545-010-9204-5) PMID: [20844963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20844963/).
27. Arpan I, Willcocks RJ, Forbes SC, Finkel RS, Lott DJ, Rooney WD, et al. Examination of effects of corticosteroids on skeletal muscles of boys with DMD using MRI and MRS. *Neurology*. 2014; 83(11):974±80. doi: [10.1212/WNL.0000000000000775](https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000775) PMID: [25098537](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25098537/); PubMed Central PMCID: PMC4162304.
28. Alejandre A, Diaz-Manera J, Ravaglia S, Tibaldi EC, D'Amore F, Moris G, et al. Trunk muscle involvement in late-onset Pompe disease: study of thirty patients. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2012; 22 Suppl 2:S148±54. doi: [10.1016/j.nmd.2012.05.011](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.05.011) PMID: [22980766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22980766/).
29. Wokke BH, Bos C, Reijniere M, van Rijswijk CS, Eggers H, Webb A, et al. Comparison of dixon and T1-weighted MR methods to assess the degree of fat infiltration in duchenne muscular dystrophy patients. *Journal of magnetic resonance imaging: JMIR*. 2013; 38(3):619±24. doi: [10.1002/jmri.23998](https://doi.org/10.1002/jmri.23998) PMID: [23292884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23292884/).

30. Carlier PG, Azzabou N, de Sousa PL, Hicks A, Boisserie JM, Amadon A, et al. Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging follow-up of adult Pompe patients. *Journal of inherited metabolic disease*. 2015; 38(3):565±72. doi: [10.1007/s10545-015-9825-9](https://doi.org/10.1007/s10545-015-9825-9) PMID: [25749708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25749708/); PubMed Central PMCID: PMC4432102.
31. Pichiecchio A, Poloni GU, Ravaglia S, Ponzio M, Germani G, Maranzana D, et al. Enzyme replacement therapy in adult-onset glycogenosis II: is quantitative muscle MRI helpful? *Muscle & nerve*. 2009; 40(1):122±5. doi: [10.1002/mus.21304](https://doi.org/10.1002/mus.21304) PMID: [19533640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19533640/).
32. Gruhn KM, Heyer CM, Guttsches AK, Rehmann R, Nicolas V, Schmidt-Wilcke T, et al. Muscle imaging data in late-onset Pompe disease reveal a correlation between the pre-existing degree of lipomatous muscle alterations and the efficacy of long-term enzyme replacement therapy. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2015; 3:58±64. doi: [10.1016/j.ymgmr.2015.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2015.03.010) PMID: [26937398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26937398/); PubMed Central PMCID: PMC4750633.

1 **Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: a prospective**  
2 **study.**

3

4 Sebastian Figuerola-Bonaparte<sup>1</sup>; Jaume Llauger<sup>3</sup>; Sonia Segovia<sup>1,2</sup>; Izaskun Belmonte<sup>4</sup>;  
5 Irene Pedrosa<sup>4</sup>; Elena Montiel<sup>4</sup>; Paula Montesinos<sup>5</sup>; Javier Sánchez-González<sup>5</sup>; Alicia  
6 Alonso-Jiménez<sup>1</sup>; Eduard Gallardo<sup>1,2</sup>; Isabel Illa<sup>1,2</sup>; Spanish Pompe group and Jordi  
7 Díaz-Manera<sup>1,2</sup>.

8

9 1. Neuromuscular Disorders Unit. Neurology Department. Hospital de la Santa  
10 Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona. Spain.

11 2. Centro de Investigación en Red en Enfermedades Raras (CIBERER).

12 3. Radiology department. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat  
13 Autònoma de Barcelona. Spain.

14 4. Rehabilitation and physiotherapy department. Hospital de la Santa Creu i Sant  
15 Pau. Universitat Autònoma de Barcelona. Spain.

16 5. Philips Healthcare Iberia, Madrid, Spain

17

18 **Corresponding author:** Jordi Díaz-Manera, Neuromuscular disorders Unit, Hospital de

19 la Santa Creu I Sant Pau. Sant Antoni M<sup>a</sup> Claret 167; Barcelona 08025, Spain. Tel.:

20 +34-935565986. Fax: +34-935565602. Email: [jdiazm@santpau.cat](mailto:jdiazm@santpau.cat).

21

22

23

**1 ABSTRACT**

2 Late onset Pompe disease (LOPD) is a slow, progressive disorder characterized by  
3 skeletal and respiratory muscle weakness. Enzyme replacement therapy (ERT) slows  
4 down the progression of muscle symptoms. Reliable biomarkers are needed to follow  
5 up ERT-treated and asymptomatic LOPD patients in clinical practice. In this study, 32  
6 LOPD patients (22 symptomatic and 10 asymptomatic) underwent muscle MRI using 3-  
7 point Dixon and were evaluated at the time of the MRI with several motor function tests  
8 and patient-reported outcome measures, and again after one year. Muscle MRI showed  
9 a significant increase of 1.7% in the fat content of the thigh muscles in symptomatic  
10 LOPD patients. In contrast, there were no noteworthy differences between muscle  
11 function tests in the same period of time. We did not observe any significant changes  
12 either in muscle MRI or in muscle function tests in asymptomatic patients over the year.  
13 We conclude that 3-point Dixon muscle MRI is a useful tool for detecting changes in  
14 muscle structure in symptomatic LOPD patients and could become part of the current  
15 follow-up protocol in daily clinics.

16

## 1 INTRODUCTION

2 Pompe disease is a genetic disorder characterized by glycogen accumulation in all  
3 tissues of the body [1]. Pompe patients are classified as infantile or late onset (LOPD)  
4 depending on their age when symptoms first appear. LOPD patients have variable  
5 clinical presentations, ranging from asymptomatic hyperCKemia to limb girdle and  
6 respiratory muscle weakness [2]. Enzymatic replacement therapy (ERT) is indicated for  
7 LOPD patients with skeletal muscle weakness and/or respiratory involvement [3].  
8 Several studies have reported motor and respiratory stabilization during the first few  
9 years of ERT, and even a decrease in the mortality rate [4-9]. However, it has been  
10 suggested that ERT does not stop muscle degeneration at the histological level [10].  
11 Indeed, recently published data have shown impairment in muscle and respiratory  
12 function after several years of treatment [11].

13

14 In following up asymptomatic LOPD patients, the main aim is to detect changes in  
15 muscle function that could support ERT treatment. However, normal muscle function  
16 tests do not reveal the integrity of the muscle structure of these patients; muscle fiber  
17 loss and fatty replacement could have started without yet influencing the results of the  
18 tests. Moreover, it is questionable whether muscle function tests are precise enough to  
19 detect subtle changes, and most authors agree that we need reliable non-invasive  
20 biomarkers of disease progression [12, 13].

21

22 Quantitative muscle MRI (qMRI) has emerged as a valuable biomarker to follow up the  
23 progression of neuromuscular disorders [14-18]. qMRI is a non-invasive tool that  
24 quantifies the amount of fat present in a muscle's region of interest (ROI). The total  
25 muscle area and remaining muscle tissue can also be calculated [16, 17]. We have

1 previously demonstrated that qMRI correlates strongly with common outcome measures  
2 used in LOPD [19]. Our main aim was to investigate MRI changes occurring in the  
3 muscles of LOPD patients and assess whether qMRI was more sensitive to changes  
4 after one year than other commonly used motor function tests or patient-reported  
5 outcome measures (PROMs).  
6

1 **RESULTS**

2 **Description of the cohort**

3 We recruited 32 late onset Pompe disease (LOPD) patients for this study. They were  
 4 classified as symptomatic or asymptomatic depending on the presence of weakness at  
 5 clinical examination. Twenty-two patients were symptomatic and treated with ERT  
 6 while ten were non-symptomatic and only had hyperCKemia. This second group was  
 7 studied in neuromuscular disorder units because high levels of CKs were found in  
 8 routine blood tests (7 cases) or because they had relatives already diagnosed with  
 9 Pompe disease (3 cases). Clinical and genetic data of the patients included in the study  
 10 are described in tables 1 and 2. We found two pathogenic mutations in all our patients,  
 11 except for patient 29. That patient, in absence of defined GAA variants, was diagnosed  
 12 by biochemical results as GAA deficiency in leucocytes with the values of 0.03  
 13 nmol/min/mg protein (normal values: 0.15-1 nmol/min/mg protein) and confirmed in  
 14 fibroblasts with the value of 21.4 nmol/min/mg protein (normal values 400-600  
 15 nmol/min/mg protein).

16

N	Gender	Age at study (y)	Phenotype	Mut 1	Mut 2	CK (U/l)	ERT	Age at ERT	Wheelchair dependent	Respiratory support
1	Female	50	Proximal weakness LL + axial	IVS1-13T>G	c.1076-1G>C	251	Yes	47	N	N
2	Female	48	Proximal weakness UL and LL + axial + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.2173C>T	779	Yes	39	Y	NIV
3	Female	26	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	720	No	-	N	N
4	Female	63	Proximal	IVS1-13T>G	c.2600_2604	311	Yes	59	N	N

			weakness LL + axial		delinsA						
5	Male	11	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.573>A	276	No	-	N	N	
6	Female	45	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1532C>A	322	Yes	42	N	N	
7	Female	51	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.236_246del	240	Yes	47	N	N	
8	Female	59	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1637A>G	341	Yes	52	N	N	
9	Female	55	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.2173C>T	359	Yes	48	N	N	
10	Male	42	Proximal weakness LL + axial + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.573C>A	606	Yes	39	N	NIV	
11	Female	31	Proximal weakness UL and LL + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.1637A>G	391	Yes	24	Y	IV	
12	Male	47	Proximal weakness LL + respiratory insufficiency	c.2173C>T	c.2173C>T	508	Yes	45	N	NIV	
13	Male	51	Proximal weakness LL + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.1657C>T	709	Yes	45	N	NIV	
14	Female	51	Proximal weakness UL and LL + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.1657C>T	458	Yes	46	N	NIV	
15	Male	22	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1781G>A	126 8	No	-	N	N	



16	Male	49	HyperCKemia	c.271G>A	c.2510G>A	641	No	-	N	N
17	Male	14	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.573C>A	660	No	-	N	N
18	Female	65	Proximal weakness LL + respiratory insufficiency	c.1781G>A	c.1194+5G>A	68	Yes	64	N	N
19	Female	35	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1A>T	355	Yes	29	N	N
20	Female	40	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	831	Yes	-	N	NIV
21	Female	52	Proximal weakness LL + respiratory insufficiency	c.1781G>A	c.1194+5G>A	907	Yes	45	N	N
22	Male	64	Proximal weakness UL + LL + axial + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.2481+102_2646+31del	430	Yes	57	N	NIV
23	Male	8	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	1077	No	-	N	N
24	Female	57	Proximal weakness LL + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.1447G>T	394	Yes	55	N	NIV
25	Male	46	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1532C>A	882	Yes	43	N	NIV
26	Male	51	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1933G>T	952	Yes	51	N	NIV
27	Male	51	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1933G>T	432	No	-	N	N
28	Male	43	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1408_1410delinsTTT	317	Yes	43	N	N
29	Female	54	Proximal UL and axial weakness	*Not found	*Not found	275	Yes	48	N	N

30	Female	20	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c. 1551+1G>A	928	No	-	N	N
31	Male	50	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c. 1551+1 G>A	250	No	-	N	N
32	Female	36	HyperCKemia	IVS1-13T>G	IVS1- 13T>G	230	No	-	N	N

1 **Table 1:** Clinical characteristics of the cohort of LOPD patients participating in the  
2 study. Normal CK levels were lower than 170 U/L. Patients 13 and 14 and patients  
3 26 and 27 were siblings. Respiratory support: NIV means non-invasive ventilation  
4 while IV means invasive ventilation. UL: Upper limbs, LL: lower limbs, Y: yes, N: No.  
5

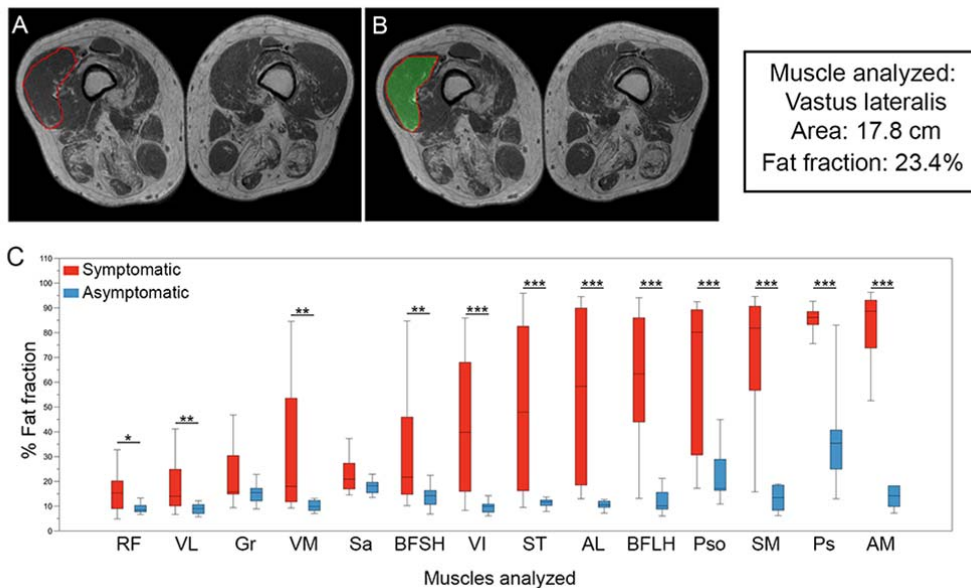
	Patients		
	ERT treated	HyperCKemia	p*
Number of patients	22	10	
Gender (W)	15, 68.2%	3, 30%	0.06*
Age at baseline	51 (45-55)	24 (13.5-49.5)	0.04
Time from onset of symptoms	15 (11-22)	-	
Time on ERT	4(2-7)	-	
Walking aids	10	-	
Ventilation	11	-	
Time to walk 10 meters (s)	7.1 (5.3-8.8)	3.1 (2.7-3.4)	0.001
6 MWT (m)	414.5 (306.2-493.2)	603 (535.2-677.7)	0.0001
Time to climb 4 steps (s)	3.4 (2.3-6.5)	1.5 (1.2-1.9)	0.005
Time to descend 4 steps (s)	2.8 (2.1-4.8)	1.4 (1.1-1.6)	0.007
Timed up & go test (s)	5.7 (3.1-7.9)	4 (2.9-5.4)	0.03
MRC	96 (84-106)	120 (118-120)	0.0001
Myometry	141 (101-231)	342 (215-491)	0.02
MFM-20 (score)	47.5 (43.5-55)	59.5 (57.5-60)	0.0001
CVF seated (%)	79.9 (60.2-88.7)	92 (85.8-103)	0.03

CVF lying (%)	68.5 (39.5-81.7)	85.5 (77.5-92.2)	0.02
Activlim (score)	21 (18-26)	18 (18-24)	>0.05
SF36 (score)	56.9 (43.7-69.9)	85.5 (69-90)	0.02
INQoL (score)	39 (23.5-53.9)	2.5 (0.9-18.1)	0.05

1 **Table 2:** Demographic and clinical data of symptomatic and asymptomatic Pompe  
 2 patients included in the study. Median value and 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles are shown for  
 3 every variable. S: seconds, m: meters.

4  
 5 **Baseline Muscle MRI and muscle function analysis.**

6 We focused our attention on the trunk and thigh regions because these muscles are the  
 7 most commonly involved in LOPD [19, 20]. Analysis of 3-point Dixon studies showed  
 8 a higher statistical significance for the fat fraction (FF) in symptomatic compared to  
 9 asymptomatic LOPD patients in all analyzed muscles, except for *sartorius* and *gracillis*  
 10 (Figure 1C).



11  
 12 **Figure 1: Analysis of fat fraction in thigh and trunk muscles in LOPD patients at**  
 13 **baseline.** A and B show an example of how ROIs are drawn to obtain total muscle area

1 and fat fraction in 3-point Dixon images. C shows the fat fraction calculated for thigh  
 2 and trunk muscles in symptomatic (red) and asymptomatic (blue) patients. The box plot  
 3 includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile, the mid lines indicate the median, bars are the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup>  
 4 percentiles. \*P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\*P<0.001. RF: *Rectus Femoris*, VL: *Vastus*  
 5 *Lateralis*, Gr: *Gracilis*, VM: *Vastus Medialis*, Sa: *Sartorius*, BFSH: *Biceps Femoris*  
 6 *Short Head*, VI: *Vastus Intermedius*, ST: *Semitendinosus*, AL: *Adductor Longus*, BFLH:  
 7 *Biceps Femoris Long Head*, Pso: *Psoas*, SM: *Semimembranosus*, Ps: *Paraspinalis*, and  
 8 AM: *Adductor Major*.

9  
 10 Thigh FF was significantly higher in symptomatic than asymptomatic patients (Median:  
 11 34.03 vs. 11.07, Mann Whitney U test, p=0.0001). We found strong correlations  
 12 between muscle function tests and average thigh FF at baseline (Table 3). For example,  
 13 thigh FF correlated with the total MRC lower limb score (p=0.0001,  $\rho=-0.89$ ) or  
 14 6MWT results (p=0.0001,  $\rho=-0.68$ ). In contrast, there was a poor correlation between  
 15 thigh FF and respiratory parameters (CVF while seated: p=0.02,  $\rho=-0.4$ ; CVF while  
 16 lying down: p=0.17,  $\rho=-0.34$ ), as well as with the results of the patient-reported  
 17 outcome measures (INQoL: p=0.05,  $\rho=0.37$ ). We did not find a strong correlation  
 18 between thigh FF and clinical parameters such as age at baseline (p=0.03,  $\rho=0.48$ ), time  
 19 from onset of symptoms (p=0.06,  $\rho=0.32$ ), or time on ERT (p=0.013,  $\rho=0.52$ ).

20

Muscle function test	p	Spearman Correlation coefficient
<b>Muscle function tests</b>		
MRC score (all muscles)	0.0001	-0.89
MRC score (lower limbs)	0.0001	-0.91
Myometry score (all muscles)	0.0001	-0.64
Myometry score (lower limbs)	0.0001	-0.65
6MWT	0.0001	-0.68
Time to walk 10 meters	0.0001	0.80
Time to climb 4 steps	0.0001	0.84

Time to descend 4 steps	0.0001	0.75
Timed up & go test	0.021	0.40
MFM-20	0.0001	-0.75
<b>Spirometry</b>		
CVF seated	0.022	-0.40
CVF lying	0.17	
<b>Patient-reported outcomes</b>		
Activlim	0.01	0.43
SF36 total	0.08	
SF36 physical	0.004	-0.53
SF36 mental	0.86	
INQoL	0.05	0.37

1 **Table 3:** Correlation between Thigh fat fraction and muscle function tests,  
2 spirometry results and patient-reported outcomes at baseline visit. Spearman test  
3 was used to study whether there was a significant correlation between variables.  
4 Adjustment for multiple comparisons using Bonferroni correction was applied; p  
5 was considered significant if lower than 0.003.

6  
7 **One year muscle MRI and muscle function analysis**

8 We repeated muscle function tests, spirometry, patient-reported outcome measures and  
9 muscle MRI for all patients after one year. In symptomatic patients, muscle function  
10 tests, spirometry and patient-reported outcomes did not show significant changes from  
11 baseline to year 1 (Table 4). In contrast, 3-point Dixon images detected a median  
12 increase of 1.7% in thigh FF that was statistically significant (paired Wilcoxon signed  
13 rank test, p=0.001) (Figure 2). Changes in FF between baseline and year 1 for  
14 individual muscles are specified in Table 5.

15

	Symptomatic treated patients (baseline vs. 12-month follow-up) (n=22)	P value	Asymptomatic patients (baseline vs. 12-month follow-up) (n=10)	P value
Muscle function tests				
<b>MRC total, score</b>	0 (-4;+6)	0.79	0 (0;+1)	0.31
<b>MRC Lower</b>	0 (-5;+4)	0.54	0 (0)	0.31

<b>limbs, score</b>				
<b>Knee extension (Nm)</b>	10.74 (0;+20.44)	0.19	-0.96 (-18.11;+3.15)	0.40
<b>Knee flexion (Nm)</b>	1.84 (-1.26;+5.97)	0.20	-0.51 (-10.13;+6.43)	0.67
<b>Hip flexion (Nm)</b>	3.97 (-1.7;+9.84)	0.14	-0.75 (-15.1;+3.9)	0.40
<b>Hip extension (Nm)</b>	2 (-0.13;+5.47)	0.08	-4.15 (-16.04;+1.82)	0.40
<b>6-MWT, m</b>	0 (-9.5;+11)	0.96	10 (-24.7;+7.5)	0.48
<b>Time to walk 10 m, seconds</b>	0(-1.44;+0.4)	0.43	-0.1(-2.52;+0.32)	0.91
<b>Time to climb 4 steps, seconds</b>	0 (-0.42;+0.5)	0.77	-0.1 (-0.32; 0)	0.39
<b>Time to descend 4 steps, seconds</b>	0 (-0.35;+1.32)	0.43	-0.05 (-0.12;+0.1)	0.55
<b>Timed up &amp; go test, sec</b>	0.6 (-0.4;+5.2)	0.47	-0.15 (-0.72;+0.97)	0.94
<b>MFM-20, score</b>	0 (-2;+2)	0.63	0 (0;+1)	0.33
Respiratory studies				
<b>CVF seated (%)</b>	-0.3 (-4;+3)	0.24	0 (-6;+5.77)	0.73
<b>CVF lying (%)</b>	0 (-6.2;+7.62)	0.73	9 (-2;+12)	0.13
Muscle MRI				
<b>qMRI Thighs</b>	1.79 (+0.2;+2.4)	<b>0.001</b>	-0.11 (-0.82;+0.4)	0.57
<b>qMRI Paraspinal</b>	-0.03 (-2.23;+0.73)	0.34	0 (-1.25;+1.89)	0.77
Patient-reported outcomes				
<b>Activlim</b>	33 (+1;+59)	0.81	67.5 (+37.5;+70.2)	0.31
<b>SF36</b>	1.8 (+0.67;+10.73)	0.22	3.28 (+24.84;+10.12)	0.89
<b>INQoL</b>	-2.9 (-5.5;+0.73)	0.17	-4.3 (-8.2;+1.1)	0.31

1

2

3

4

5

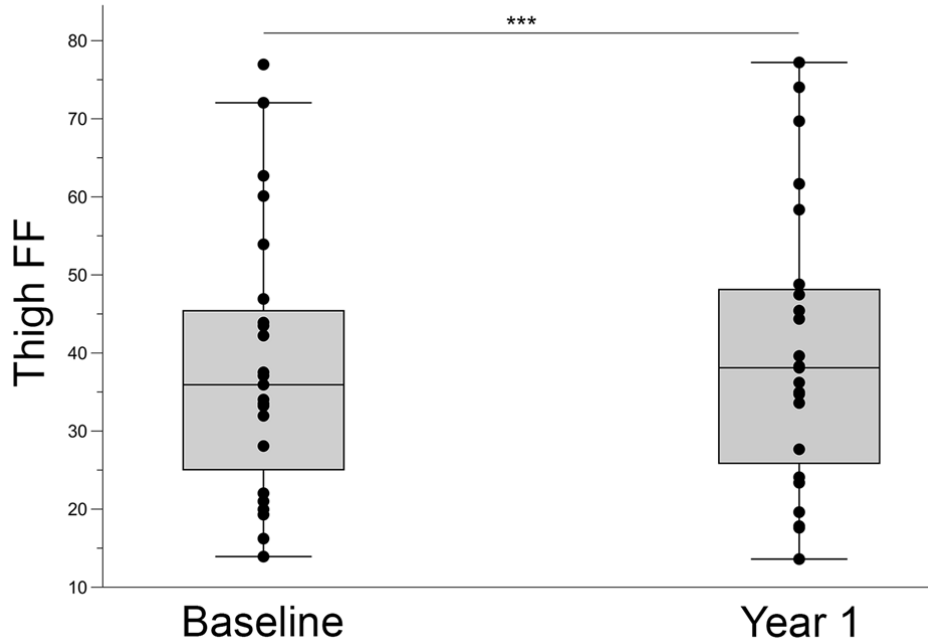
6

7

8

9

**Table 4:** Change between baseline and year 1 evaluation in muscle function tests, spirometry, quantitative muscle MRI and patient reported outcome measures in symptomatic and asymptomatic LOPD patients. Median value and 25th-75<sup>th</sup> percentiles are shown. Paired Wilcoxon signed rank test was used to find out whether the differences observed between baseline and year 1 evaluation were statistically significant. Adjustment for multiple comparisons using Bonferroni correction was applied; p was considered significant if lower than 0.002.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7

**Figure 2: Yearly progression in thigh muscle fat replacement in symptomatic LOPD patients.** The box plot includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile, the mid lines indicate the median, bars are the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup> percentiles. Each dot represents one symptomatic LOPD patient. Mann-Whitney U Test, \*\*\*P<0.001

	Symptomatic treated patients (baseline vs. 12-month follow-up)	P value	Asymptomatic patients (baseline vs. 12-month follow-up)	P value
<i>Rectus Femoris</i>	0.44 (+0.02;+2.22)	0.04	-1.04 (-1.94-0.19)	0.13
<i>Vastus Lateralis</i>	1.4 (+0.01;+2.99)	0.009	-0.55 (-1.3;+0.22)	0.24
<i>Vastus Medialis</i>	0.22 (-1.04;+2.8)	0.15	0.48 (-1.34;+2.03)	0.44
<i>Vastus Intermedius</i>	1.66 (+0.24;+3.21)	<b>0.001</b>	-0.54 (-1;+0.05)	0.13
<i>Biceps Femoral short head</i>	1.76 (-0.3;+2.78)	0.007	0.01 (-1.23;+2.64)	0.64
<i>Biceps femoral long head</i>	1.2 (-0.2;+3.3)	0.006	0.36 (-0.79;+0.64)	0.64
<i>Adductor Longus</i>	0.04 (-1.6;+1.24)	0.93	-0.2 (-1.62;+1.35)	0.50
<i>Adductor Magnus</i>	0.51 (-0.06;+1.66)	0.053	0.3 (-1.79;+1.03)	0.57
<i>Sartorius</i>	1.03 (-0.85;+2.34)	0.08	-0.97 (-1.38;+1.13)	0.38

<i>Gracillis</i>	-0.11 (-2.44;+1.79)	0.73	-0.71 (-1.79;+0.77)	0.44
<i>Semitendinosus</i>	1.17 (0;+3.22)	0.02	-0.45 (-1.9;+0.77)	0.59
<i>Semimembranosus</i>	0.6 (-0.61;+3.15)	0.10	1.82 (-0.16;+3.21)	0.02
<b>Total thigh</b>	1.79 (+0.2;+2.4)	<b>0.001</b>	-0.11 (-0.82;+0.4)	0.57
<b>Paraspinal</b>	-0.03 (-2.23;+0.73)	0.34	0 (-1.25;+1.89)	0.77
<b>Psoas</b>	0.97 (+0.06;+0.95)	0.02	-0.91 (-3.08;+2.71)	0.67

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11 We studied whether demographic or clinical factors such as sex or age at the start of

12 ERT were associated with the increase of thigh FF at year 1. We only found a

13 significant correlation between baseline thigh FF and increase of thigh FF at year 1

14 (Spearman test  $p=0.024$ ;  $\rho=0.48$ ). The thigh FF value in a single patient is an average

15 value of fat present in muscles at different stages of involvement, from mild

16 involvement to complete fat replacement. It has recently been shown that the basal

17 status of muscles could influence response to treatment and consequently their increase

18 in FF [21]. For this reason, in an exploratory post-hoc analysis, we decided to study all

19 muscles as separate variables. We classified muscles as having mild fatty infiltration

20 when FF at baseline was lower than 30%, moderate infiltration when FF at baseline was

21 between 30 and 60%, and severe infiltration when FF at baseline was higher than 60%.

22 There were significant differences in the increase in FF between the three groups after

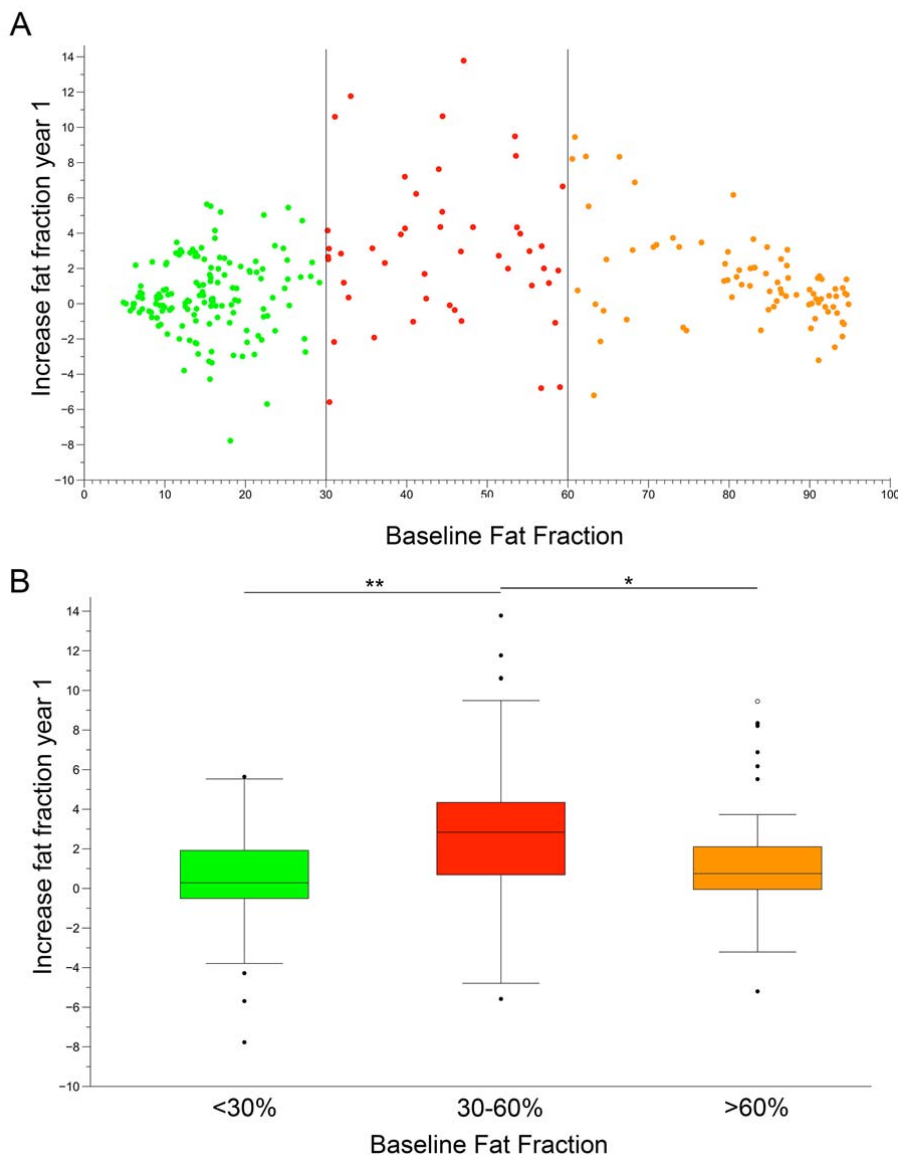
23 one year (Kruskal-Wallis,  $p<0.0001$ , Figure 3). We observed that FF in muscles with

24 less than 30% FF at baseline increased less than muscles with FF between 30 and 60%



1 after one year (median +0.28% vs. +2.84%,  $p < 0.0001$ ). In a similar way, FF in muscles  
 2 with more than 60% FF at baseline increased less than muscles with FF between 30 and  
 3 60% during the same period (median +0.75% vs. +2.84%,  $p = 0.004$ ).

4  
 5



6

7 **Figure 3:** Yearly progression of fat replacement in individual muscles of symptomatic  
 8 patients. A: Each dot represents fat fraction calculated in a single muscle. Vertical lines  
 9 divide muscles based on baseline fat fractions: low (green dots, 0-30%), intermediate

1 (red dots, 30-60%) and severe (orange dots, 60-90%). B: Increase in muscle fat  
2 replacement related to baseline fat fraction. The box plot includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>  
3 percentile, the mid lines indicate the median, bars correspond to the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup> percentiles.

4 Black dots are outliers. Kruskal-Wallis test, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

5

6

7 Muscle FF did not change significantly in asymptomatic LOPD patients. The median  
8 change in thigh FF in this group was -0.11% (Paired Wilcoxon signed rank test,  
9 P=0.57). We did not find significant changes in muscle function tests in this group of  
10 patients after the one year follow-up (Table 4).

11

## 1 **DISCUSSION**

2 In the present study we show that quantitative muscle MRI using 3-point Dixon is a  
3 useful tool for monitoring disease progression in patients with late onset Pompe disease.  
4 qMRI was more sensitive to the changes over a period of one year than other more  
5 conventional muscle tests. We analyzed a large cohort of LOPD patients including  
6 symptomatic treated patients and asymptomatic patients with hyperCKemia. Our  
7 results support the addition of qMRI to the protocol currently used to follow up LOPD  
8 patients. In the case of treated patients, qMRI could be useful for analyzing treatment  
9 response. For asymptomatic patients, meanwhile, an increase in fat infiltration detected  
10 by qMRI, before clinical symptoms are evident, should be taken into account when  
11 considering ERT or a closer follow-up of progression.

12

13 Hereditary myopathies are characterized by slow progression over the years. Skeletal  
14 muscle is replaced by fat and fibrotic tissue leading to muscle weakness [22]. However,  
15 annual changes in muscle strength and function can be subtle and difficult to quantify,  
16 and it is not uncommon to find a heterogeneous rate of progression among patients. For  
17 these reasons, establishing the progression rate of hereditary myopathies is a difficult  
18 task. This difficulty needs to be addressed, especially at present, when several drugs  
19 designed to slow down the progression of these diseases are being tested in clinical  
20 trials[23]. To keep up with these therapeutic advances, the neuromuscular field needs  
21 reliable biomarkers to detect subtle changes in muscle structure and function [24-26].

22

23 qMRI has recently been suggested as a useful tool for following up patients with  
24 various neuromuscular diseases [13, 15, 18, 27, 28]. We analyzed the progression of  
25 muscle fat infiltration in patients with LOPD over a period of one year using a qMRI

1 sequence, the 3-point Dixon, which has been reported to be a valuable outcome  
2 measure, reproducible and more sensitive to change after a short period of time than  
3 muscle function tests [17]. Our results agree with this previous observation. However,  
4 in our opinion, 3-point-Dixon has some limitations. Analysis of the images is still  
5 performed by hand as ROIs are manually drawn on muscle sections, making the  
6 evaluation of images a time-consuming task that requires a high degree of expertise and  
7 patience. Software that can automatically calculate fat fraction on an entire slice stack  
8 has been developed, but has not yet been applied to neuromuscular disorders [29]. As  
9 fat infiltration is not homogeneous through all the muscle, several slices should be  
10 analyzed to calculate median fat infiltration. Moreover, the analysis of a new set of  
11 images obtained from the same patients after a period of time requires internal anatomic  
12 landmarks to facilitate the recognition of slices that were previously quantified.

13

14 This is the largest prospective study using qMRI in LOPD patients reported so far. We  
15 analyzed 22 LOPD patients treated with ERT in a wide range of clinical situations, from  
16 wheelchair-bound patients requiring ventilation, to patients with slight weakness and no  
17 major problems in daily activities [30, 31]. Two reports including longitudinal data of  
18 qMRI imaging from LOPD patients have already been published. Dr. Carlier and  
19 collaborators performed a retrospective analysis of 14 LOPD patients treated with ERT  
20 and found a significant increase of 0.9% in FF of all lower limb muscles during a one  
21 year period [32]. The EMBASSY study provided follow-up data for 16 LOPD patients  
22 using muscle function tests or repeated muscle biopsies [33]. Five of the 16 patients  
23 were also followed up using qMRI which included 3-point Dixon. After six months, a  
24 mean increase of 0.6% in FF of all leg muscles was observed. However, both studies  
25 analyzed lower leg muscles, such as *tibialis anterior* or *soleus*, that are commonly less

1 involved in LOPD, probably reducing the final average increase in FF observed [19,  
2 20].

3  
4 Our study also adds new information about the natural progression of pathology in  
5 Pompe disease. 3-point Dixon imaging quantifies fat infiltration in skeletal muscles,  
6 which is a common pathological change observed in neuromuscular disorders. In the  
7 case of LOPD, the earliest pathological change is the accumulation of glycogen inside  
8 lysosomes in the sarcoplasm [34]. The progressive addition of lysosomes has two  
9 consequences. On the one hand, there is dysfunction in the contractile properties of the  
10 myofiber. On the other, the cellular autophagy process is impaired, leading to an  
11 accumulation of debris inside the muscle fiber [35-37]. Eventually, the muscle fiber  
12 degenerates and dies, and is replaced by fat, which is detectable using muscle MRI.  
13 ERT has been shown to reduce the accumulation of glycogen in the sarcoplasm and  
14 reactivate cellular autophagy, reducing muscle fiber loss [37]. We therefore argue that  
15 3-point Dixon could be useful in following up the progression of muscle fiber loss and  
16 fatty replacement in LOPD, which is the final consequence of glycogen accumulation in  
17 lysosomes. However, 3-point Dixon imaging does not identify glycogen, which would  
18 be very useful in following up asymptomatic patients for whom muscle fiber necrosis  
19 has probably just started or is minimal [38]. MRI sequences to detect glycogen in  
20 human tissue have been developed, including  $(^{13}\text{C})$ -MR spectroscopy, chemical  
21 exchange saturation transfer imaging or proton MRS. However, this technology is not  
22 routinely available on standard clinical scanners [39]. MRI sequences commonly used  
23 in clinical centers include T1, 3-point Dixon, T2 and STIR [40]. An increase in the  
24 STIR signal in muscles from LOPD patients has recently been described, with the  
25 suggestion that this is related to the presence of water molecules retained by glycogen

1 [41]. Nevertheless, this increase was not detected in all Pompe patients. In a similar  
2 way, an increased T2 signal has been described in some muscles in Pompe patients [32].  
3 Although the increase in STIR signal has been related to accumulation of water or  
4 edema, the increase in T2 signal is not specific and can be observed in muscle fiber  
5 necrosis, inflammation, or presence of free water [42, 43]. We therefore still need MRI  
6 sequences capable of identifying glycogen that can be used in clinical settings, and  
7 future research should focus on this area.

8  
9 We detected an average increase in FF of 1.7% in symptomatic ERT treated patients  
10 after one year of follow-up. In contrast, no functional changes were observed in the  
11 same period of time. The increase in FF detected in ERT-treated patients is probably not  
12 enough to produce a functional change. However, the progressive increase of FF could  
13 result in a deterioration of muscle function after several years, as has been recently  
14 described in patients treated with ERT for more than 5 years [11]. It would be very  
15 valuable to identify the ratio of FF increase in non-treated symptomatic LOPD patients.

16 One of the limitations of this study is that we had no control group including  
17 symptomatic non-treated patients, because ERT usually starts soon after patients  
18 develop muscle symptoms.

19  
20 The factors that could influence the response of LOPD to ERT are still not known. The  
21 majority of muscles had a slow, continuous progression despite ERT treatment, which is  
22 reminiscent of that observed in other slow, progressive muscular dystrophies. We  
23 observed that those muscles which were less infiltrated at the basal evaluation were the  
24 ones that progressed the least. This finding has also been reported by other groups  
25 studying Pompe disease. In our opinion, this may be due to the fact that in muscles with

1 a certain degree of degeneration, autophagic vacuoles accumulate, impairing the  
2 transport of the enzyme from the sarcolemma to the lysosomes and probably reducing  
3 the effect of ERT [35-37]. However, this rate of progression has also been described in  
4 patients with facioscapulohumeral muscle dystrophy [28], suggesting that a certain  
5 amount of baseline damage in skeletal muscles can be associated with a more rapid  
6 progression of the disease. If this were confirmed, early treatment of patients could  
7 result in a better and longer-lasting response to drugs, although this should be further  
8 investigated in a prospective clinical trial [21, 37]. In any case, we think qMRI may  
9 play an important role in the early detection of fatty infiltration in muscle, which would  
10 suggest following up asymptomatic patients more closely.

11

12 Based on our results, we conclude that qMRI is a very efficient tool for demonstrating  
13 the muscular condition of Pompe patients from the morphological point of view, and to  
14 monitor symptomatic and asymptomatic LOPD patients treated or not with ERT in daily  
15 clinics. However, its utility in detecting muscle degeneration in short therapeutic trials  
16 may be questionable.

17

18

## 1 **METHODS**

### 2 **Study design and participants**

3 We are conducting a prospective observational study following up LOPD patients at the  
4 Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) in Barcelona. This comprises annual  
5 evaluations, including muscle function tests, spirometry, quality of life scales and  
6 quantitative muscle MRI. This study is registered in ClinicalTrials.gov with the  
7 identifier NCT01914536. The HSCSP ethics committee approved the study and all  
8 participants signed an informed consent form. All study procedures were performed in  
9 accordance with Spanish regulations.

10 Inclusion criteria for the study were: 1) Diagnosis of LOPD based on recommendations  
11 recently proposed by the European Pompe Consortium; reduced enzymatic activity in  
12 leukocytes, fibroblasts or skeletal muscle and/or the presence of two mutations in the  
13 *GAA* gene following the diagnostic [44]; 2) No contraindications to MRI; 3) Symptoms  
14 of muscle weakness starting after the age of 18; 4) Willingness to complete all muscle  
15 function tests, respiratory assessment and patient-reported outcomes measures.

16

17 All patients were studied by two physiotherapists (I.B. and I.P.) with considerable  
18 experience in neuromuscular disorders at HSCSP in Barcelona. The physiotherapists  
19 evaluated muscle function using the following tests: the 6 minute walking test, time to  
20 walk 10 meters, timed up-and-go test, time to climb up and down 4 steps, and the motor  
21 function measure-20 item scale (MFM-20) [45]. Muscle strength was studied using both  
22 the Muscle Research Council scale (MRC) and hand-held myometry. ACTIVLIM,  
23 INQoL and SF-36 were used as patient-reported outcome measures [46]. We obtained  
24 forced vital capacity, both seated and lying down, using the Carefusion Microlab ML  
25 3500 MK8 spirometer (Carefusion, Yorba Linda, CA, USA).



1 Patients were classified as symptomatic or asymptomatic. We considered a patient  
2 symptomatic when muscle weakness was found in clinical examination using the MRC  
3 scale, or when Forced Vital Capacity was at less than 85% of the normal values.

4

5

## 6 **Muscle imaging**

7 All patients were examined in a Philips Achieva XR 1.5 Tesla located at HSCSP. We  
8 used the same positioning protocol for all patients: a supine position with the legs  
9 stretched out, the patella facing upwards and the ankles in a neutral position.

10 Axial 3D 3-point Dixon images were acquired with the following acquisition  
11 parameters: TR/TE=5.78/1.8, 4 ms, flip angle=15°, FOV=520x340x300 mm, voxel  
12 size=1x1x3 mm for thighs and FOV=520x320x200 mm and voxel size=1.3x1.7x5 mm  
13 for the lower trunk. The acquisition time was 45 minutes per patient.

14 Two investigators (S.F-B. and J.D-M.) analyzed 3-point Dixon MR images using the  
15 PRIDE (Philips Research Image Development Environment) tool. ROIs were manually  
16 drawn on five slices of the following muscles: *rectus femoris*, *vastus intermedius*, *vastus*  
17 *lateralis*, *vastus medialis*, *adductor magnus*, *sartorius*, *gracilis*, *semitendinosus* and  
18 *semimembranosus*; on three slices of *biceps femoris long head*, *biceps femoris short*  
19 *head* and *adductor longus*; and on two slices for *psoas* and lumbar paraspinal muscles.

20 We used anatomical landmarks to ensure consistency between baseline and year 1  
21 analysis: we took the last slice in which the femoral head was observed as a reference,  
22 and analyzed muscles every 5 cm along the entire thigh.

1 For every ROI, the total area and area covered by fat were calculated automatically  
2 using the PRIDE tool (Figure 1A and B). The fat fraction coefficient was defined as  
3  $\frac{fat}{fat + water}$  where *fat* and *water* were the image intensity values over the ROI for  
4 the fat and water Dixon images respectively. From those two parameters, and assuming  
5 that water content corresponds mainly to muscle, fat and muscle area were estimated.  
6 Accumulative values across all slices were also computed and, as a final index, muscle  
7 Fat Fraction (FF) was calculated as follows:  $FF = (\text{muscle fat area} \times 100) / \text{muscle}$   
8 *area*. Once we obtained the values from every muscle we calculated thigh fat fraction as  
9 follows:  $\text{thigh FF} = (\text{Sum of fat area of all thigh muscles} \times 100) / \text{sum of muscle area of all}$   
10 *thigh muscles*).

11 The average time to quantify fat fraction in 3-point Dixon images was 60 minutes. A  
12 high degree of reliability was found between investigators. The IIC coefficient was  
13 0.982 with a 95% confidence interval from 0.977 to 0.987.

#### 14 **Statistics**

15 We used non-parametric tests for the statistical analysis of the variables. We used the  
16 Mann-Whitney U test to investigate whether there were significant differences between  
17 variables between groups (symptomatic vs. asymptomatic). Agreement between fat  
18 fraction measurements in quantitative muscle MRI, taken by two different investigators,  
19 was measured using the Intraclass Correlation Coefficient (IIC). We used the paired  
20 Wilcoxon signed rank test to investigate whether there were significant changes in  
21 motor function tests, spirometry, quality of life scales and the fat fraction measurements  
22 obtained with qMRI between the baseline and year 1 visit. We used Spearman's rank  
23 correlation (coefficient reported as  $\rho$ ) to investigate whether there was a correlation  
24 between the results of the muscle function tests, spirometry, quality of life scales and

1 the thigh fat fraction obtained using qMRI. As we ran multiple correlations, a  
2 Bonferroni test was performed to avoid type 1 errors. An ROC curve was performed to  
3 study whether thigh fat fraction was able to differentiate between symptomatic and  
4 asymptomatic Pompe patients with high sensitivity and specificity. The results of all  
5 statistical studies were considered significant if P was lower than 0.05. Statistical  
6 studies were performed using IBM SPSS® Statistics software version 21.  
7 The datasets generated during the current study are available from the corresponding  
8 author on reasonable request.  
9

1 **References**

- 2 [1]. Bembi, B. *et al.* Diagnosis of glycogenosis type II. *Neurology*. **71**,S4-11  
3 (2008).
- 4 [2]. Schuller, A., Wenninger, S., Strigl-Pill, N. & Schoser, B. Toward  
5 deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin*  
6 *Med Genet*. **160C**, 80-88 (2012).
- 7 [3]. van der Ploeg, A.T., *et al.* A randomized study of alglucosidase alfa in late-  
8 onset Pompe's disease. *N Engl J Med*. **362**, 1396-1406 (2010).
- 9 [4]. van der Ploeg, A.T. *et al.* Open-label extension study following the Late-  
10 Onset Treatment Study (LOTS) of alglucosidase alfa. *Mol Genet Metab*. **107**, 456-  
11 461 (2012).
- 12 [5]. Gungor, D. *et al.* Impact of enzyme replacement therapy on survival in  
13 adults with Pompe disease: results from a prospective international observational  
14 study. *Orphanet J Rare Dis*. **8**, 49 (2013).
- 15 [6]. Angelini, C. *et al.* Observational clinical study in juvenile-adult glycogenosis  
16 type 2 patients undergoing enzyme replacement therapy for up to 4 years. *J Neurol*.  
17 **259**, 952-958 (2012).
- 18 [7]. Stepien, K.M., Hendriks, C.J., Roberts, M. & Sharma, R. Observational clinical  
19 study of 22 adult-onset Pompe disease patients undergoing enzyme replacement  
20 therapy over 5 years. *Mol Genet Metab*. **117**, 413-418 (2016).
- 21 [8]. de Vries, J.M. *et al.* Effect of enzyme therapy and prognostic factors in 69  
22 adults with Pompe disease: an open-label single-center study. *Orphanet J Rare Dis*.  
23 **7**, 73 (2012).
- 24 [9]. Schoser, B. *et al.* Survival and long-term outcomes in late-onset Pompe  
25 disease following alglucosidase alfa treatment: a systematic review and meta-  
26 analysis. *J Neurol*. **264**, 621-630 (2017).
- 27 [10]. Raben, N. *et al.* Enzyme replacement therapy in the mouse model of Pompe  
28 disease. *Mol Genet Metab*. **80**, 159-169 (2003).
- 29 [11]. Kuperus, E. *et al.* Long-term benefit of enzyme replacement therapy in  
30 Pompe disease: A 5-year prospective study. *Neurology*. **89**, 2365-73 (2017).
- 31 [12]. De Filippi, P. *et al.* Genotype-phenotype correlation in Pompe disease, a step  
32 forward. *Orphanet J Rare Dis*. **9**, 102 (2014).
- 33 [13]. Morrow, J.M. *et al.* MRI biomarker assessment of neuromuscular disease  
34 progression: a prospective observational cohort study. *Lancet Neurol*. **15**, 65-77  
35 (2016).
- 36 [14]. Willcocks, R.J. *et al.* Multicenter prospective longitudinal study of magnetic  
37 resonance biomarkers in a large duchenne muscular dystrophy cohort. *Ann Neurol*.  
38 **79**, 535-547 (2016).
- 39 [15]. Willis, T.A. *et al.* Quantitative magnetic resonance imaging in limb-girdle  
40 muscular dystrophy 2I: a multinational cross-sectional study. *PLoS One*. **9**, e90377  
41 (2014)
- 42 [16]. Lokken, N., Hedermann, G., Thomsen, C. & Vissing, J. Contractile properties  
43 are disrupted in Becker muscular dystrophy, but not in limb girdle type 2I. *Ann*  
44 *Neurol*. **80**, 466-471 (2016).
- 45 [17]. Burakiewicz, J. *et al.* Quantifying fat replacement of muscle by quantitative  
46 MRI in muscular dystrophy. *J Neurol*. **264**, 2053-2067 (2017).

- 1 [18]. Willis, T.A. *et al.* Quantitative muscle MRI as an assessment tool for  
2 monitoring disease progression in LGMD2I: a multicentre longitudinal study. *PLoS*  
3 *One.* **8**,e70993 (2013).
- 4 [19]. Figuroa-Bonaparte, S. *et al.* Muscle MRI Findings in Childhood/Adult Onset  
5 Pompe Disease Correlate with Muscle Function. *PLoS One.* **11**, e0163493 (2016).
- 6 [20]. Carlier, R.Y. *et al.* Whole-body muscle MRI in 20 patients suffering from late  
7 onset Pompe disease: Involvement patterns. *Neuromuscul Disord.* **21**, 791-799  
8 (2011)
- 9 [21]. Gruhn, K.M. *et al.* Muscle imaging data in late-onset Pompe disease reveal a  
10 correlation between the pre-existing degree of lipomatous muscle alterations and  
11 the efficacy of long-term enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab Rep.* **3**, 58-  
12 64 (2015).
- 13 [22]. Wallace, G.Q. & McNally, E.M. Mechanisms of muscle degeneration,  
14 regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol.* **71**, 37-57  
15 (2009).
- 16 [23]. Straub, V. *et al.* Stakeholder cooperation to overcome challenges in orphan  
17 medicine development: the example of Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*  
18 *Neurol.* **15**, 882-890 (2016).
- 19 [24]. Fatehi, F., Salort-Campana, E., Le Troter, A., Bendahan, D. & Attarian, S.  
20 Muscle MRI of facioscapulohumeral dystrophy (FSHD): A growing demand and a  
21 promising approach. *Rev Neurol (Paris).* **172**, 566-571 (2016).
- 22 [25]. Grolez, G. *et al.* The value of magnetic resonance imaging as a biomarker for  
23 amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *BMC Neurol.* **16**, 155 (2016).
- 24 [26]. Straub, V. & Bertoli, M. Where do we stand in trial readiness for autosomal  
25 recessive limb girdle muscular dystrophies? *Neuromuscul Disord.* **26**, 111-125  
26 (2016).
- 27 [27]. Willcocks, R.J. *et al.* Longitudinal measurements of MRI-T2 in boys with  
28 Duchenne muscular dystrophy: effects of age and disease progression.  
29 *Neuromuscul Disord.* **24**, 393-401 (2014).
- 30 [28]. Andersen, G. *et al.* MRI as outcome measure in facioscapulohumeral  
31 muscular dystrophy: 1-year follow-up of 45 patients. *J Neurol.* **264**, 438-447  
32 (2017).
- 33 [29]. Baudin, P.Y., Azzabou, N., Carlier, P.G. & Paragios, N. Prior knowledge,  
34 random walks and human skeletal muscle segmentation. *Med Image Comput*  
35 *Comput Assist Interv.* 2012 **15**, 569-576.
- 36 [30]. Echaniz-Laguna, A. *et al.* Should patients with asymptomatic pompe disease  
37 be treated? A nationwide study in France. *Muscle Nerve.* **51**, 884-889 (2015).
- 38 [31]. Hagemans, M.L. *et al.* Disease severity in children and adults with Pompe  
39 disease related to age and disease duration. *Neurology.* **64**, 2139-2141 (2005).
- 40 [32]. Carlier, P.G. *et al.* Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance  
41 imaging follow-up of adult Pompe patients. *J Inherit Metab Dis.* **38**, 565-572  
42 (2015).
- 43 [33]. van der Ploeg, A. *et al.* Prospective exploratory muscle biopsy, imaging, and  
44 functional assessment in patients with late-onset Pompe disease treated with  
45 alglucosidase alfa: The EMBASSY Study. *Mol Genet Metab.* **119**, 115-123 (2016).
- 46 [34]. Thurberg, B.L. *et al.* Characterization of pre- and post-treatment pathology  
47 after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Invest.* **86**, 1208-1220  
48 (2006).

- 1 [35]. Raben, N., Wong, A., Ralston, E. & Myerowitz, R. Autophagy and  
2 mitochondria in Pompe disease: nothing is so new as what has long been forgotten.  
3 *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* **160C**, 13-21 (2012).
- 4 [36]. Nascimbeni, A.C., Fanin, M., Masiero, E., Angelini, C. & Sandri, M. The role of  
5 autophagy in the pathogenesis of glycogen storage disease type II (GSDII). *Cell*  
6 *Death Differ.* **19**, 1698-1708 (2012).
- 7 [37]. Ripolone, M. *et al.* Effects of short-to-long term enzyme replacement  
8 therapy (ERT) on skeletal muscle tissue in late onset Pompe disease (LOPD).  
9 *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017.
- 10 [38]. Pichiecchio, A. *et al.* Asymptomatic Pompe disease: Can muscle magnetic  
11 resonance imaging facilitate diagnosis? *Muscle Nerve.* **53**, 326-327 (2016).
- 12 [39]. van Zijl, P.C., Jones, C.K., Ren, J., Malloy, C.R. & Sherry, A.D. MRI detection of  
13 glycogen in vivo by using chemical exchange saturation transfer imaging  
14 (glycoCEST). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 4359-4364 (2007).
- 15 [40]. Filli, L., Winklhofer, S., Andreisek, G. & Del Grande, F. Imaging of Myopathies.  
16 *Radiol Clin North Am.* **55**, 1055-1070 (2017).
- 17 [41]. Pichiecchio, A. *et al.* Muscle MRI of classic infantile pompe patients: Fatty  
18 substitution and edema-like changes. *Muscle Nerve.* **55**, 841-848 (2017).
- 19 [42]. Azzabou, N. & Carlier, P.G. Fat quantification and T2 measurement. *Pediatr*  
20 *Radiol.* **44**, 1620-1621 (2014).
- 21 [43]. Kim, H.K. *et al.* Quantitative Skeletal Muscle MRI: Part 2, MR Spectroscopy  
22 and T2 Relaxation Time Mapping-Comparison Between Boys With Duchenne  
23 Muscular Dystrophy and Healthy Boys. *AJR Am J Roentgenol.* **205**, W216-223  
24 (2015).
- 25 [44]. van der Ploeg, A.T. *et al.* European consensus for starting and stopping  
26 enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year  
27 experience. *Eur J Neurol.* **24**, 768-e31 (2017).
- 28 [45]. Harris, E. *et al.* The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy: An  
29 international multicenter study. *Neurol Genet.* **2**, e89 (2016).
- 30 [46]. Vandervelde, L., Van den Bergh, P.Y., Goemans, N. & Thonnard, J.L.  
31 ACTIVLIM: a Rasch-built measure of activity limitations in children and adults with  
32 neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord.* **17**, 459-469 (2007).

34

1 **Acknowledgments**

2

3 We would like to thank the Spanish Association of Patients with Glycogenesis (www.

4 glucogenesis.org) for their support for our investigation. We thank Neil McMillan for

5 editorial support and Ignasi Gich for help with statistics. We thank the entire MRI

6 technician team: Esther Alemany, Nieves Campillos, Elisenda Mestres, Eugenia Torres,

7 Ricard Cullell, Ingrid Rubio, Alberto Fernández, and Mario González, for their patience

8 and support for the study. We also thank Mrs. Concepción Escolá for her assistance

9 during the visits of the study. This investigation was sponsored by two grants, one from

10 Sanofi Genzyme and another from the Spanish Ministry of Health, Fondos FEDER-

11 ISCIII PI15/01822 to Dr. Jordi Díaz-Manera.

12

1 **Additional information:**

2

3 **Competing interests:**

4

5 The study was supported by Sanofi-Genzyme. The company did not interfere in the

6 design of the protocol or review any data obtained from patients. There are no

7 other conflicts of interest.

8

9



1 **Author Contributions:**

2 SFB designed the protocol, visited the patients, analyzed muscle MRIs and wrote  
3 the paper.

4 JL designed the protocol and wrote the paper.

5 SS coordinated the study, visited the patients and reviewed the paper.

6 IB, IP and EM designed the protocol, visited the patients and acquired motor  
7 function data.

8 PM and JSG designed the protocol and wrote the paper.

9 AAJ visited the patients and reviewed the paper.

10 II and EG designed and discussed the protocol.

11 JDM designed the protocol, visited the patients, analyzed the images, wrote the  
12 paper and obtained funding for the study.

13

14

1 **Figure legends**

2 **Figure 1: Analysis of fat fraction in thigh and trunk muscles in LOPD patients at**

3 **baseline.** A and B show an example of how ROIs are drawn to obtain total muscle area

4 and fat fraction in 3-point Dixon images. C shows the fat fraction calculated for thigh

5 and trunk muscles in symptomatic (red) and asymptomatic (blue) patients. The box plot

6 includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile, the mid lines indicate the median, bars are the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup>

7 percentiles. \*P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\*P<0.001. RF: *Rectus Femoris*, VL: *Vastus*

8 *Lateralis*, Gr: *Gracilis*, VM: *Vastus Medialis*, Sa: *Sartorius*, BFSH: *Biceps Femoris*

9 *Short Head*, VI: *Vastus Intermedius*, ST: *Semitendinosus*, AL: *Adductor Longus*, BFLH:

10 *Biceps Femoris Long Head*, Pso: *Psoas*, SM: *Semimembranosus*, Ps: *Paraspinalis*, and

11 AM: *Adductor Major*.

12

13 **Figure 2: Yearly progression in thigh muscle fat replacement in symptomatic**

14 **LOPD patients.** The box plot includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile, the mid lines indicate

15 the median, bars are the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup> percentiles. Each dot represents one symptomatic

16 LOPD patient. Mann-Whitney U Test, \*\*\*P<0.001

17

18 **Figure 3: Yearly progression of fat replacement in individual muscles of symptomatic**

19 **patients.** A: Each dot represents fat fraction calculated in a single muscle. Vertical lines

20 divide muscles based on baseline fat fractions: low (green dots, 0-30%), intermediate

21 (red dots, 30-60%) and severe (orange dots, 60-90%). B: Increase in muscle fat

22 replacement related to baseline fat fraction. The box plot includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>

23 percentile, the mid lines indicate the median, bars correspond to the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup> percentiles.

24 Black dots are outliers. Kruskal-Wallis test, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

25

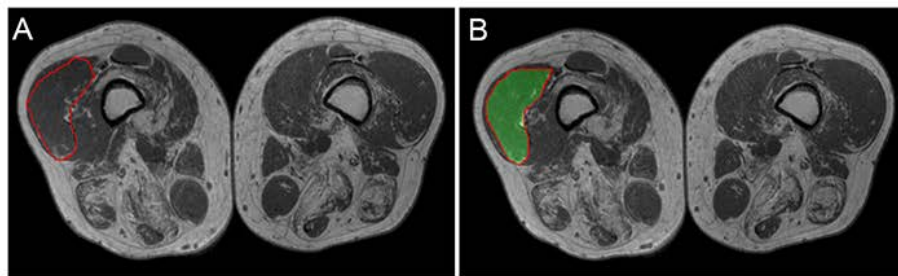
1 **Co-investigators – The Spanish Pompe Study Group:**

2 Miguel Angel Barba-Romero<sup>6</sup>, Joseba Barcena<sup>7</sup>, Pilar Carbonell<sup>8</sup>, María Rosario  
 3 Carzorla<sup>9</sup>, Carlota Creus<sup>10</sup>, Jaume Coll-Cantí<sup>11</sup>, Manuel Díaz<sup>12</sup>, Cristina Domínguez<sup>13</sup>,  
 4 Roberto Fernández Torrón<sup>14</sup>, María José García Antelo<sup>15</sup>, Josep Maria Grau<sup>16</sup>, Adolfo  
 5 López de Munáin<sup>14</sup>, Francisco Antonio Martínez-García<sup>17</sup>, Yolanda Morgado<sup>18</sup>, Antonio  
 6 Moreno<sup>19</sup>, Germán Morís<sup>20</sup>, Miguel Angel Muñoz-Blanco<sup>21</sup>, Andres Nascimento<sup>22</sup>, José  
 7 Luis Parajuá Pozo<sup>23</sup>, Arturo Robledo-Strauss<sup>24</sup>, Íñigo Rojas-Marcos<sup>25</sup>, Jose António  
 8 Salazar<sup>26</sup>, Mercedes Usón<sup>27</sup>

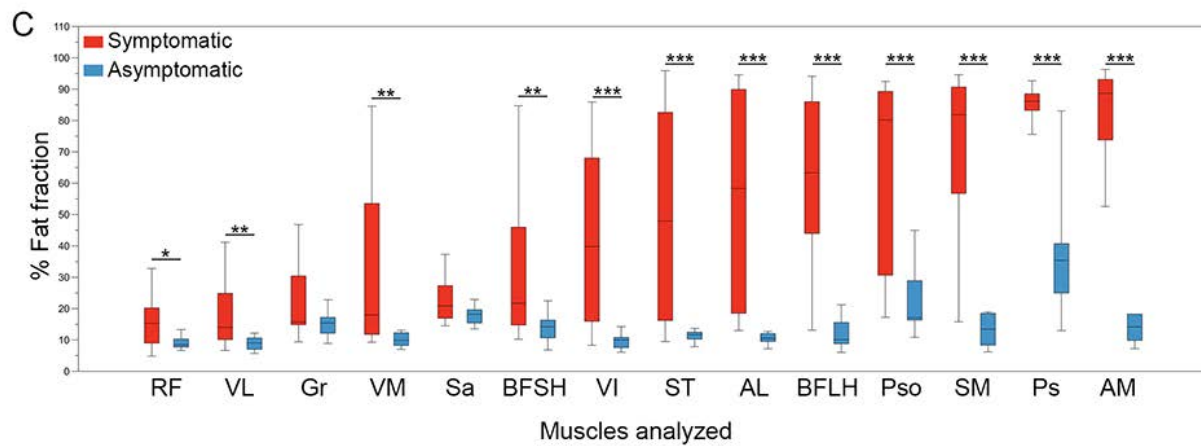
9

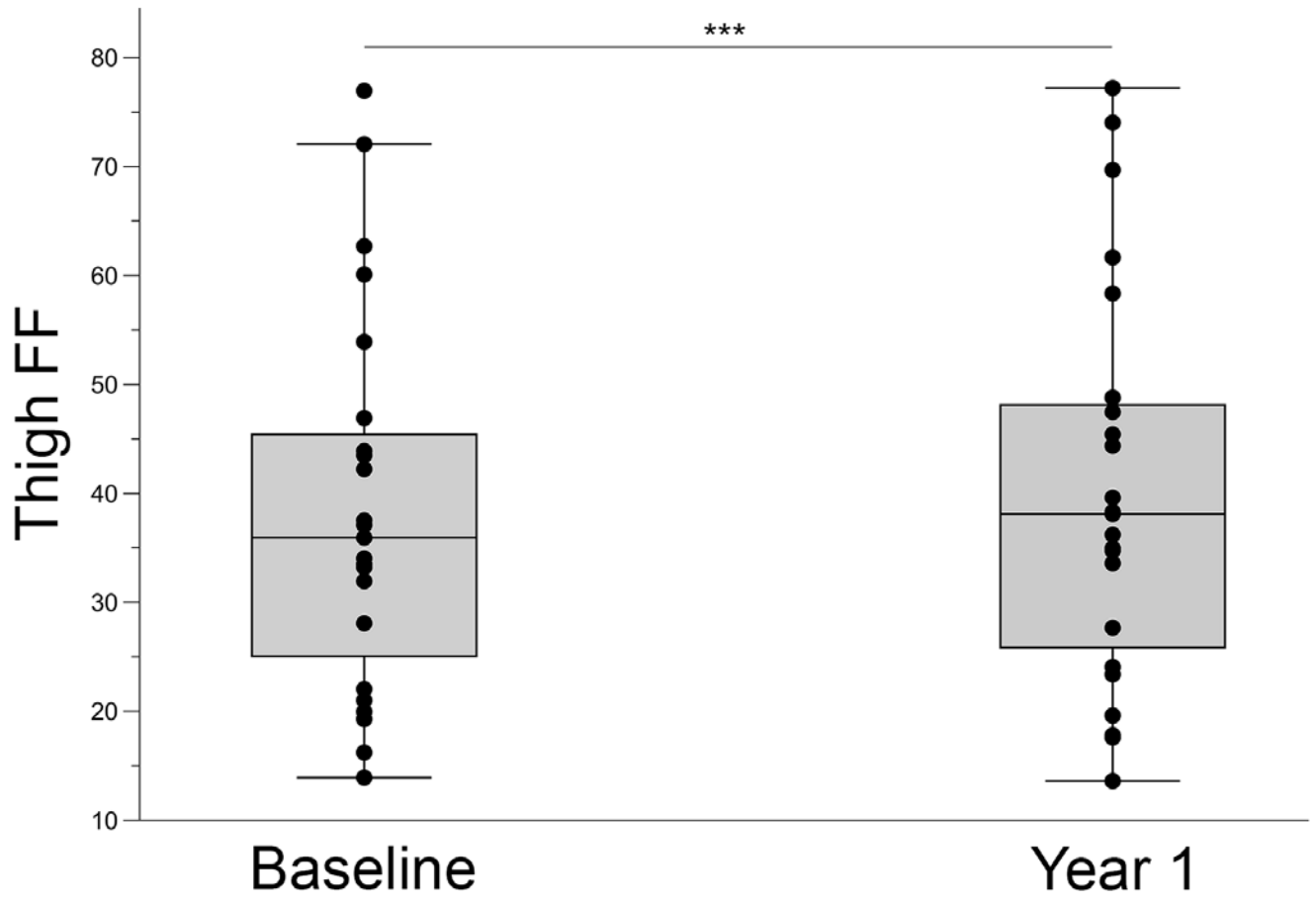
- 10 6. Internal Medicine Department. Hospital General de Albacete, Albacete, Spain
- 11 7. Neurology department, Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Spain.
- 12 8. Neurology department, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.
- 13 9. Pediatrics Department, Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain.
- 14 10. Neurology Department, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain.
- 15 11. Neurology Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain.
- 16 12. Neurology Department, Hospital de Cabueñes, Gijón, Spain.
- 17 13. Neurology Department, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain.
- 18 14. Neurology Department, Hospital Universitario Donostia, Spain.
- 19 15. Neurology Department, Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain.
- 20 16. Internal Medicine Department. Hospital Clínic, Barcelona, Spain
- 21 17. Neurology department, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca,  
 22 Murcia, Spain
- 23 18. Neurology Department. Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla, Spain
- 24 19. Neurology Department, Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia,  
 25 Spain.

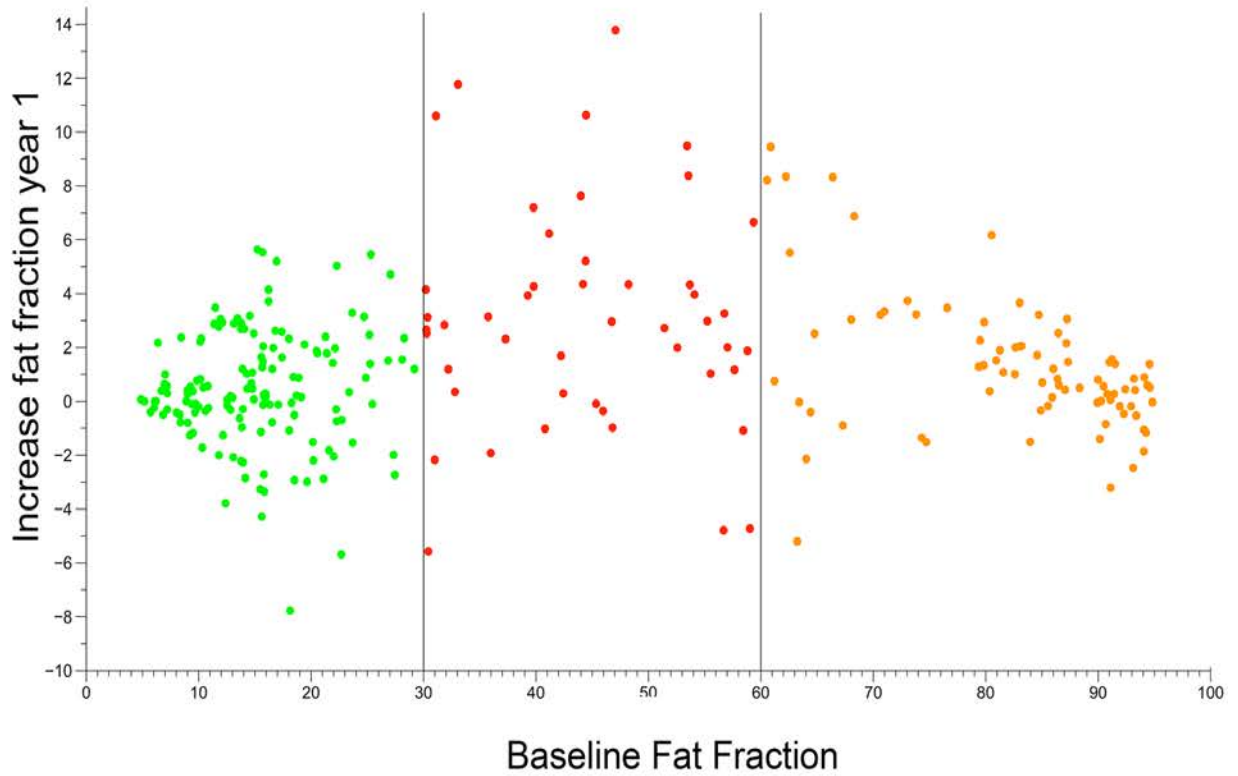
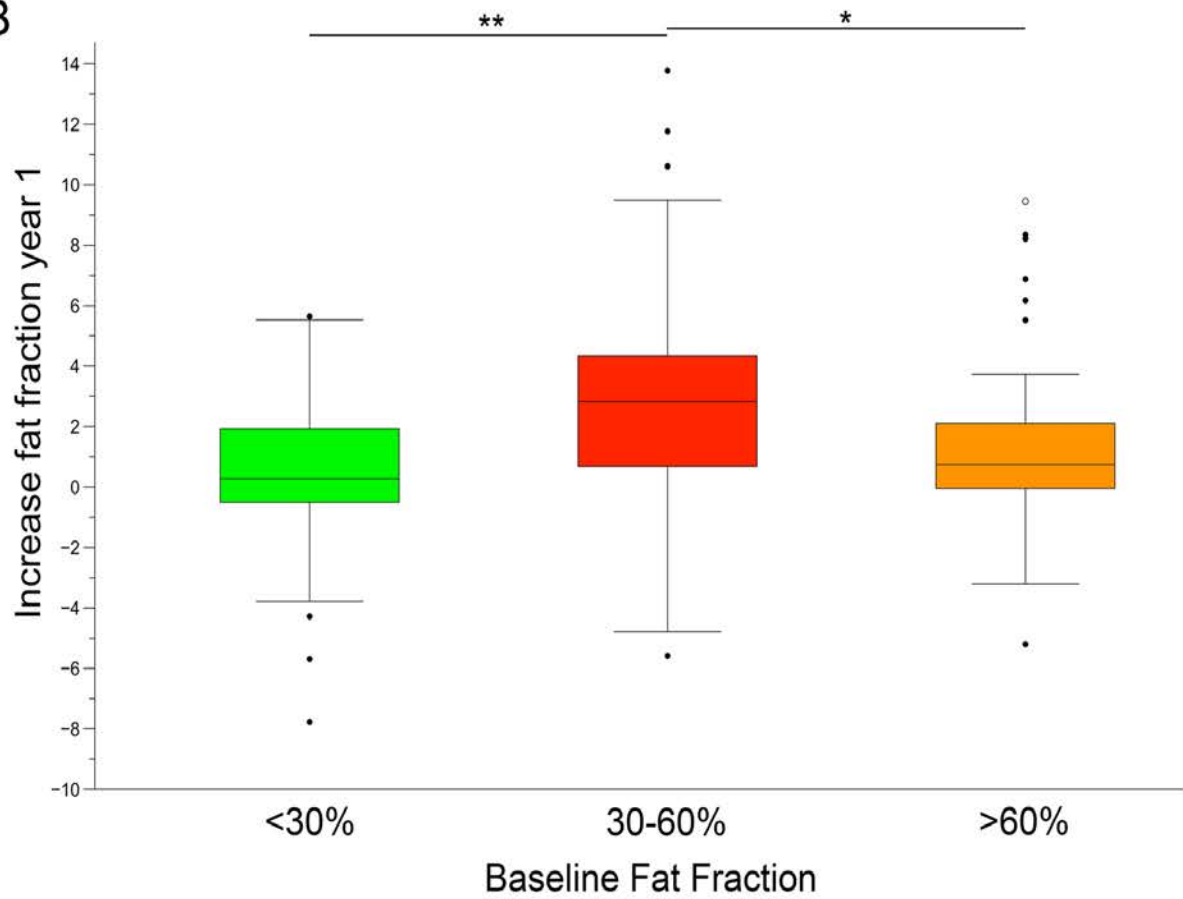
- 1 20. Neurology Department, Hospital Universitario de Asturias, Oviedo, Spain.
- 2 21. Neurology Department, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain.
- 3 22. Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.
- 4 23. Internal Medicine Department, Hospital de Can Mises, Ibiza, Spain.
- 5 24. Neurology Department, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain.
- 6 25. Neurology Department, Hospital Virgen de Macarena, Sevilla, Spain.
- 7 26. Neurology Department, Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain.
- 8 27. Neurology Department, Hospital de Son Llàtzer, Palma de Mallorca, Balearic
- 9 Islands, Spain.
- 10



Muscle analyzed:  
 Vastus lateralis  
 Area: 17.8 cm  
 Fat fraction: 23.4%





**A****B**





RESEARCH ARTICLE

# Muscle MRI Findings in Childhood/Adult Onset Pompe Disease Correlate with Muscle Function

Sebastián Figueroa-Bonaparte<sup>1,2</sup>, Sonia Segovia<sup>1,2</sup>, Jaume Llauger<sup>3</sup>, Izaskun Belmonte<sup>4</sup>, Irene Pedrosa<sup>4</sup>, Aina Alejalde<sup>1,2</sup>, Mercè Mayos<sup>5</sup>, Guillermo Suárez-Cuartán<sup>5</sup>, Eduard Gallardo<sup>1,2</sup>, Isabel Illa<sup>1,2</sup>, Jordi Díaz-Manera<sup>1,2\*</sup>, Spanish Pompe Study Group<sup>¶</sup>

**1** Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, **2** Centro de Investigación en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), **3** Radiology department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, **4** Rehabilitation and physiotherapy department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, **5** Respiratory diseases department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

¶ Membership of the Spanish Pompe Study Group is provided in the Acknowledgments.

\* [jdiazm@santpau.cat](mailto:jdiazm@santpau.cat)



OPEN ACCESS

**Citation:** Figueroa-Bonaparte S, Segovia S, Llauger J, Belmonte I, Pedrosa I, Alejalde A, et al. (2016) Muscle MRI Findings in Childhood/Adult Onset Pompe Disease Correlate with Muscle Function. PLoS ONE 11(10): e0163493. doi:10.1371/journal.pone.0163493

**Editor:** Maurilio Sampaolesi, Katholieke Universiteit Leuven, BELGIUM

**Received:** April 5, 2016

**Accepted:** September 9, 2016

**Published:** October 6, 2016

**Copyright:** © 2016 Figueroa-Bonaparte et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Data contain identifying information and are unsuitable for public sharing. Data may be requested from the corresponding author.

**Funding:** This work was supported by a grant from Genzyme to JDM (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01914536?term=pompe+disease&rank=13>) and a grant from the Spanish Ministry of Health, FISS PI15/01822 to JDM. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

### Objectives

Enzyme replacement therapy has shown to be effective for childhood/adult onset Pompe disease (AOPD). The discovery of biomarkers useful for monitoring disease progression is one of the priority research topics in Pompe disease. Muscle MRI could be one possible test but the correlation between muscle MRI and muscle strength and function has been only partially addressed so far.

### Methods

We studied 34 AOPD patients using functional scales (Manual Research Council scale, hand held myometry, 6 minutes walking test, timed to up and go test, time to climb up and down 4 steps, time to walk 10 meters and Motor Function Measure 20 Scale), respiratory tests (Forced Vital Capacity seated and lying, Maximum Inspiratory Pressure and Maximum Expiratory Pressure), daily live activities scales (Activlim) and quality of life scales (Short Form-36 and Individualized Neuromuscular Quality of Life questionnaire). We performed a whole body muscle MRI using T1w and 3-point Dixon imaging centered on thighs and lower trunk region.

### Results

T1w whole body muscle MRI showed a homogeneous pattern of muscle involvement that could also be found in pre-symptomatic individuals. We found a strong correlation between muscle strength, muscle functional scales and the degree of muscle fatty replacement in muscle MRI analyzed using T1w and 3-point Dixon imaging studies. Moreover, muscle MRI detected mild degree of fatty replacement in paraspinal muscles in pre-symptomatic patients.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Conclusion

Based on our findings, we consider that muscle MRI correlates with muscle function in patients with AOPD and could be useful for diagnosis and follow-up in pre-symptomatic and symptomatic patients under treatment.

## Take home message

Muscle MRI correlates with muscle function in patients with AOPD and could be useful to follow-up patients in daily clinic.

## Introduction

Childhood/adult onset Pompe disease (AOPD) is a genetic disorder caused by mutations in the *GAA* gene leading to a deficiency of the enzyme acid  $\alpha$ -glucosidase[1]. This enzyme degrades glycogen inside the lysosomes. Glycogen accumulates in skeletal muscles of AOPD patients leading to a number of pathologic changes producing muscle weakness[2]. AOPD patients may have different clinical presentations, such as asymptomatic hyperCKemia, slowly progressive limb girdle weakness and respiratory insufficiency secondary to respiratory muscle weakness[3].

Enzyme replacement therapy with alfa-glucosidase (ERT) has changed the natural history of AOPD[4]. Published studies show that ERT improves muscle function during the first months of treatment and stabilizes clinical situation over time[5–7]. One of the main drawbacks of this treatment is the high cost of the drug per patient and year (more than 250.000\$/year). Considering that the drug stabilizes function but lifelong treatment is needed, health authorities have expressed concern regarding how to measure the effectiveness of treatment and when therapy should be started[8]. Clinical guides suggest that muscle MRI could be useful to follow progression of the disease in treated patients or to monitor signs of muscle deterioration in patients with asymptomatic hyperCKemia, anticipating the onset of their treatment[9–11].

Muscle MRI is a useful tool to study the structure of skeletal muscles. There are several sequences that analyzes different aspects of muscle [12]. T1-weighted (T1w) and 3-point Dixon imaging provide information on fat infiltration in muscle[13, 14]. T1w imaging has been used to identify patterns of muscle fatty infiltration helpful for the diagnosis of muscles diseases[15, 16]. Recent studies have pointed out the utility of 3-point Dixon sequences to quantify the percentage of fatty infiltration in muscles and follow-up patients over a period of time[17, 18]. However it is not yet known whether the degree of muscle fatty infiltration correlates with muscle strength and function in AOPD patients. This question needs to be addressed prior to consider muscle MRI as a surrogate biomarker of disease progression, especially at present, when ERT has changed the natural history of the disease. To tackle this question, we performed a transversal observational study in a large group of AOPD patients comparing muscle function tests with results of T1w and 3-Point Dixon muscle imaging.

## Material and Methods

### Clinical assessment

We are currently conducting a prospective observational study following-up a cohort of 34 genetically confirmed AOPD patients at the Hospital of Sant Pau. This study is registered in the webpage ClinicalTrials.gov with the identifier NCT01914536. All patients provided written informed consent to participate in the study. The study was reviewed and approved by the Ethics Committee at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

We collected data concerning epidemiological characteristics, general medical background and current clinical status at basal visit. Two physiotherapists evaluated muscle function using the following tests: 6-minutes walking test (6MWT), time to walk 10 meters, time to up-and-go, time to climb up and down 4 steps, and motor function measure-20 items scale (MFM-20). Daily living activities were studied using Activlim test and quality of life was investigated using INQoL and SF-36 questionnaires.

Muscle strength was studied using both Muscle Research Council scale (MRC) and hand-held myometry. Using MRC, which grades muscle strength from 0 (no movement) to 5 (normal strength), we evaluated neck flexion and extension, arm abduction, elbow flexion and extension, finger flexion and extension, hip flexion, extension, adduction and abduction, knee flexion and extension, and foot flexion, extension, inversion, and eversion. Trunk flexion and extension functions, which are not commonly studied using MRC, were analyzed as follows: normal movement: 5 points, ineffective muscle contraction: 3 points, no muscle contraction: 0 points. We defined a MRC total score as the aggregate of MRC scores of every single function analyzed.

Using hand-held myometry we evaluated the following muscle functions: neck flexion, arm abduction, elbow flexion and extension, hip flexion, extension, adduction, and abduction, knee flexion and extension. These studies were performed only on patient's dominant side. A myometry score was defined as the aggregate of scores obtained with the myometer.

We obtained forced vital capacity seated (sFVC), forced vital capacity in a lying position (IFVC), maximum inspiratory pressure (MIP) and maximum expiratory pressure (MEP) using a conventional spirometry. We performed a blood analysis to all patients to test CK levels before physiotherapy assessment. The normal values of CK in our laboratory are less than 174 U/L.

## Muscle MRI

Whole body muscle MRI was performed in a Philips Achieva XR 1.5 Teslas device at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Axial T1 weighted turbo spin echo images were obtained using the following acquisition parameters TR = 757 ms, TE = 17 ms, thickness = 8 mm, number of slices = 164, FOV = 530 x 530 mm, acquired voxel size = 1.6 x 2.88 mm. 3-point Dixon images were acquired in 3D with the following acquisition parameters: TR/TE = 5.78/1.8, 4 ms, flip angle = 15 degrees, FOV = 520 x 340 x 300 mm, voxel size = 1 x 1 x 3 mm of both thighs and FOV = 520 x 320 x 200 mm and voxel size = 1.3 x 1.7 x 5 mm for the lower trunk. Water and fat images were automatically obtained from the Dixon acquisition. The time to obtain all the images was 45 minutes per patient.

Two observers (J.D. and J.L.) quantified fatty muscle infiltration in T1w imaging using the modified version of the Mercuri score published by the group of Dr. Fischer [19]:

- *Normal muscle appearance*: 0 points
- *Mild*: traces of increased signal intensity on the T1-weighted MR sequences: 1 point
- *Moderate*: increased T1-weighted signal intensity with beginning confluence in less than 50% of the muscle: 2 points
- *Severe*: increased T1-weighted signal intensity with beginning confluence in more than 50% of the muscle: 3 points
- *End-stage appearance*: entire muscle replaced by increased density of connective tissue and fat: 4 points

Each muscle was evaluated at both sides. A complete list of the muscles analyzed can be found in [S1 Materials](#). We generated a muscle MRI score that was calculated adding all the

values obtained from the muscles analyzed. Its value ranged from 0 (lowest value, all muscles are scored as 0) to 290 (highest value, all muscles are scored as 4).

To analyze 3-point Dixon images we chose five cross-sectional Dixon slices of thighs and lower trunk, in which muscle volume was highest. A complete list of the muscles analyzed can be found in [S1 Materials](#). We mapped full cross-section of muscle groups or individual muscles and the fat fractional data were generated.

A single observer (S.F-B) estimated fat content in the muscles using the PRIDE platform (Philips Research Image Development Environment) which enables analysis of Dixon images. In order to calculate the fat fraction, a ROI (Region of Interest) was drawn in both the fat and water images. Fat fraction coefficient was defined as  $\text{fat}/(\text{fat}+\text{water})$  where fat and water are the image intensity values over the ROI for the water and fat images respectively.

## Statistics

We used Shapiro-Wilk test to confirm that none of our measured variables were normally distributed and we used non-parametric statistic tests for the analysis.

Mann-Whitney U test was used to compare quantitative variables and Chi-square test to compare qualitative variables. To investigate whether there was a correlation between the muscle function scales and MRI findings we used Spearman's rank correlation (coefficient reported as  $r$ ). We considered the correlation was good if  $P$  was lower than 0.05 and  $r$  was 0.65 or higher. Hierarchical analysis and graphical representation as a heatmap was performed using R software version 3.1.3 as previously described[20]. Statistical studies were performed using SPSS<sup>®</sup> Statistics software version 21 from IBM<sup>®</sup>. All data acquired from the visits and analysis of the MRIs can be found in the Supplemental Study Data Section.

## Results

### Clinical description of the cohort

We included 34 patients with a diagnosis of AOPD ([Table 1](#)). Seven patients were considered asymptomatic as they had only hyperCKemia, without any clinical symptom of muscle weakness, while 27 patients were considered symptomatic as they had muscle weakness. HyperCKemia patients were younger than symptomatic ones (21.4 y.o. vs 50.18 y.o, Mann-Whitney U test,  $p < 0.001$ ) ([Table 2](#)).

The most common clinical complaint was muscle weakness involving lower limbs. Only 20% of patients had problems raising their arms. Twelve patients used aids for walking such as cane or stick, while two patients were wheelchair bound. Exertion dyspnea was present in 60% of patients and orthopnea was present in 28%. Thirteen of 27 symptomatic patients (48.1%) were on respiratory support; which was non-invasive and nocturnal in 12 patients and invasive in 1 patient.

Twenty-two of the 27 symptomatic patients were treated with ERT, while none of the hyperCKemia patients were under ERT. The mean age at which ERT was started was  $45.7 \pm 9$  years old. The mean time on ERT when the tests were performed was  $4.4 \pm 1.03$  years.

### Analysis of muscle function

The MRC scale detected muscle weakness in all symptomatic patients. Hierarchical clustering analysis of the MRC scale scores showed that paraspinal, abdominal and proximal muscles of lower limbs were the weakest muscles ([Fig 1](#)). In general, hip extension was weaker than hip flexion and thigh adduction was weaker than thigh abduction. Mean muscle MRC score was 161.5 points (range 124–180). MRC score had a poor correlation with age at the time of the

**Table 1. List of patients participating in the study.**

N	Gender	Age at Study (y)	Phenotype	GAA gene		CK (U/l)	ERT	Age at ERT (y)	Wheelchair dependent	Ventilation
				Mut 1	Mut 2					
1	F	50	Proximal weakness LL + axial	IVS1-13T>G	c.1076-1G>C	251	Yes	47	N	N
2	F	48	Proximal weakness UL and LL + axial + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G IVS1-13T>G	c.2173C>T	779	Yes	39	Y	Y
3	F	26	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	779	No	-	N	N
4	F	63	Proximal weakness LL + axial	IVS1-13T>G	c.2600_2604delinsA	311	Yes	59	N	N
5	M	11	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.573C>A	276	No	-	N	N
6	F	45	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1532C>A	322	Yes	42	N	N
7	F	51	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.236_246del	240	Yes	47	N	N
8	M	66	Axial + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.1933G>T	406	No	-	N	N
9	F	59	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1637A>G	341	Yes	52	N	N
10	F	55	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.2173C>T	359	Yes	48	N	N
11	M	42	Proximal weakness LL + axial + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.573C>A	606	Yes	39	N	Y
12	F	31	Proximal weakness UL and LL + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.1637A>G	391	Yes	24	Y	Y
13	F	46	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	C.1192dupC	396	Yes	39	N	N
14	M	47	Proximal weakness LL + respiratory insuf@ciency	c.2173C>T	c.2173C>T	508	Yes	45	N	Y
15	M	51	Proximal weakness LL + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.1657C>T	709	Yes	45	N	Y
16	F	51	Proximal weakness UL and LL + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.1657C>T	458	Yes	46	N	Y
17	M	22	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1781G>A	1268	No	-	N	N
18	M	49	HyperCKemia	c.271G>A	c.2510G>A	641	No	-	N	N
19	M	14	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.573C>A	660	No	-	N	N
20	F	65	Proximal weakness LL + respiratory insuf@ciency	c.1781G>A	c.1194+5G>A	68	Yes	64	N	N
21	F	35	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1A>T	355	Yes	29	N	N
22	F	40	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	831	No	-	N	Y
23	F	52	Proximal weakness LL + respiratory insuf@ciency	c.1781G>A	c.1194+5G>A	907	Yes	45	N	N
24	M	64	Proximal weakness UL + LL + axial + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.2481+102_2646+31del	430	Yes	57	N	Y
25	M	8	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	1077	No	-	N	N
26	F	57	Proximal weakness LL + respiratory insuf@ciency	IVS1-13T>G	c.1447G>T	394	Yes	55	N	Y
27	M	46	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1532 C>A	882	Yes	43	N	Y
28	M	51	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1933G>T	952	Yes	51	N	Y
29	M	51	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1933G>T	432	No	-	N	Y
30	M	43	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1408_1410delinsTTT	317	Yes	43	N	N
31	F	54	Axial	*Not found	*Not found	275	Yes	48	N	N
32	M	42	Proximal weakness UL + LL	IVS1-13T>G	c.655G>A	886	No	-	N	N
33	F	20	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1551+1G>A	928	No	-	N	N

(Continued)

Table 1. (Continued)

N	Gender	Age at Study (y)	Phenotype	GAA gene		CK (U/l)	ERT	Age at ERT (y)	Wheelchair dependent	Ventilation
				Mut 1	Mut 2					
34	M	50	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1637A>G	492	No	-	N	Y

Patient 31: Diagnosis was confirmed by enzymatic quantitation in muscle biopsy and peripheral blood lymphocytes. No mutation was found in the GAA gene. F, female. M, male

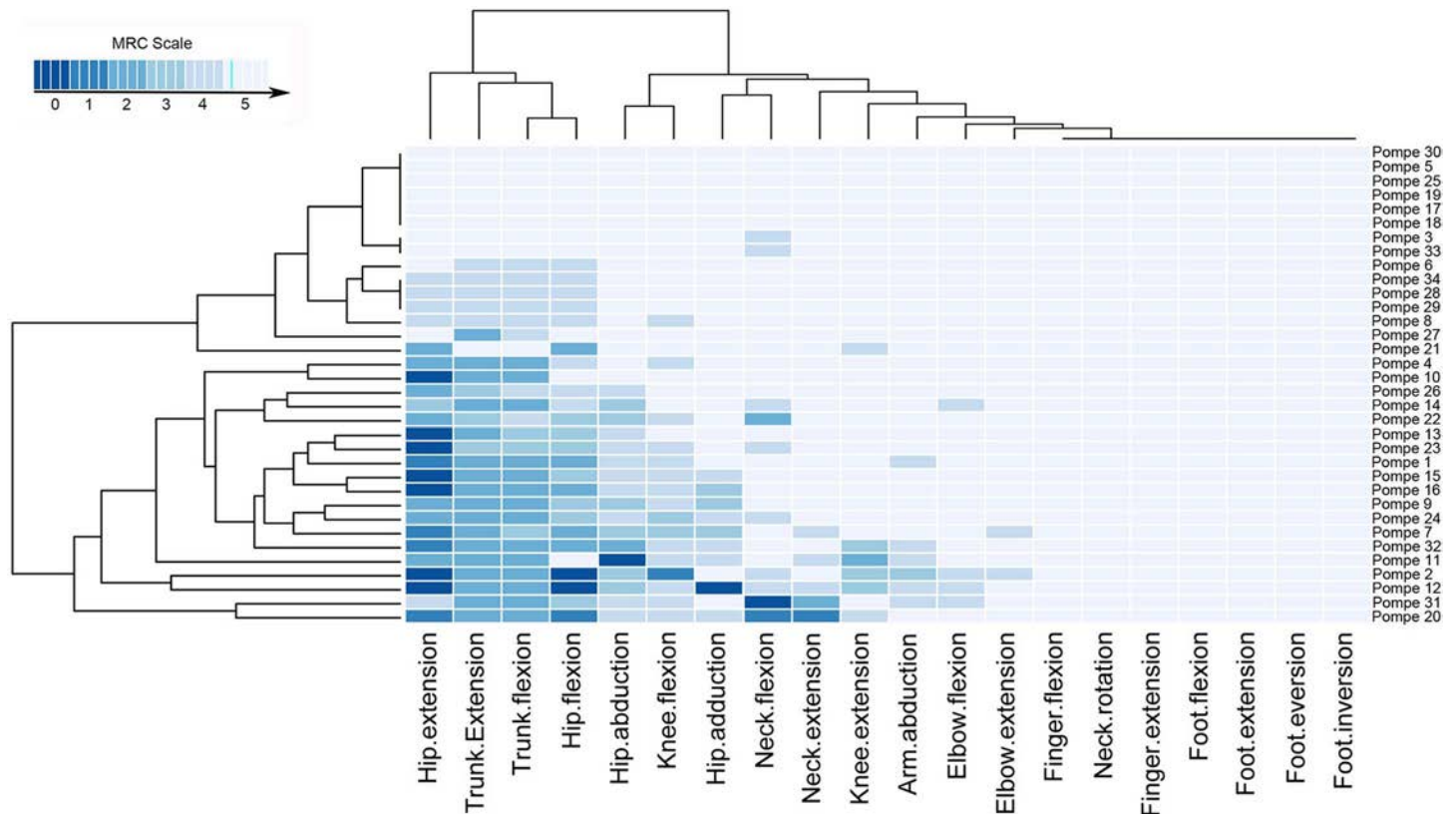
doi:10.1371/journal.pone.0163493.t001

study (Spearman test,  $p=0.015$ ;  $r = -0.414$ ), with time from onset of the symptoms (Spearman test,  $p=0.018$ ;  $r = -0.404$ ) and with gender (Spearman test,  $p = 0.009$ ,  $r: 0.441$ ) and did not correlate with delay in the start of ERT (Table 3). In contrast, MRC score had a good correlation with the results of most of muscle function tests used in clinical trials such as 6MWT or the time to climb up and down four stairs, and also with scales measuring daily live activities (Activlim) or muscle function (MFM-20). Correlation between MRC score and Quality of life scales was statistically significant, but correlation coefficient was poor. We also measured strength using hand-held myometry. The mean myometry score was 196.3 points (range 55–

Table 2. Demographic, clinical and radiologic features of hyperCKemia and symptomatic Pompe patients.

	HyperCKemia (N = 7)	Symptomatic (n = 27)	Statistical significance
Demographic characteristics			
Age at study (y)	21.4 (+/-15.5)	50.1 (+/-8.9)	<0.001
Gender female	2/7 (28.6%)	16/27 (59.3%)	0.124*
Delay in diagnosis (y)	6.1(+/- 5.1)	9 (+/- 7)	0.367
Time of progression (y)	NA	15.5	NA
Strength and functional scales			
Total MRC score	119.5 (0.7)	96 (15.5)	<0.001
Myometry score (Nm)	288.28 (137.3)	196.63 (136.1)	0.143
Time to walk 10 meters (sec)	3.22 (0.5)	7.40 (3.7)	0.006
6 minutes walking test (meters)	594 (75.6)	403.5 (147.1)	0.003
Time climb up 4 steps (sec)	1.5 (0.2)	4.7 (3.4)	0.002
Time go down 4 steps (sec)	1.4 (0.2)	3.7 (2.5)	0.022
Time to up&go (sec)	3.8 (1.5)	9.4 (8.5)	0.140
Daily live activities and quality of live scales			
Activlim	36 (6.3)	29.3 (5.9)	0.003
SF-36 (%)			0.002
INQuol	14.4	110.6	<0.001
Laboratory, respiratory and cardiac assessments			
CVF seated (%)	95.7(12.2)	75.7(22.6)	0.049
CVF lying (%)	82.3 (12.5)	64.4(27)	0.240
CPKs (U/l)	911.5 (260.9)	523.8(236.6)	0.008
Muscle MRI-T1w imaging			
Total muscle MRI Score	6 (6.8)	125.9 (46.7)	<0.001
Muscle MRI head/arms	2.1	25.3	<0.001
Muscle MRI trunk	4.9	13.7	<0.001
Muscle MRI legs	0.5	74.3	<0.001
Muscle MRI-3 point Dixon imaging			
Thighs fat fraction (%)	11.73	38.17	<0.0001
Paraspinal muscles fat fraction (%)	18.79	65.07	<0.0001

doi:10.1371/journal.pone.0163493.t002



**Fig 1. Distribution of muscle weakness in the cohort of AOPD participating in the study.** The heatmap showed the MRC value for all muscles studied. Hip extension and flexion and trunk extension and flexion were the most weak impaired movements of the patients. In contrast, we did not observe distal weakness involving the lower or the upper limbs.

doi:10.1371/journal.pone.0163493.g001

570). There was a good correlation between the total MRC score and the Myometry score (Spearman test,  $p = 0.001$ ;  $r: 0.667$ ). Myometry score correlated well with muscle function tests, but this correlation coefficient was lower than correlation coefficient obtained with MRC score (Table 3).

### Muscle MRI analysis: T1w imaging and pattern description

We performed a hierarchical clustering analysis of values obtained from the quantification of T1w muscle MRI and visualized these data using heatmaps (Fig 2). Our analysis showed predominant involvement of paraspinal muscles, abdominal muscles, tongue, *subscapularis* and *latissimus dorsi* in head and trunk. Head muscles (except tongue), upper limbs and periscapular muscles (except *subscapularis*) were not generally involved. In lower limbs, *glutei* muscles, *psoas*, *iliacus* and posterior muscles of the thighs (*semitendinosus*, *semimembranosus*, *adductor major* and *longus*, and both heads of *biceps*) were predominantly involved. *Glutei minor* and *medius* were more involved than *glutei maximus*. *Vastus intermedius* was the most commonly involved quadriceps muscle, while *rectus femoris* was rarely involved. In contrast, *sartorius* and *gracillis* muscles and lower legs muscles were commonly spared (Fig 2). We show some examples of muscle involvement in Fig 3.

We observed subtle changes in 4 of the 7 pre-symptomatic patients (Fig 2). Mild fatty infiltration (score = 1) was observed in paraspinal muscles (*multifidus*, *longissimus*, *iliocostalis*),

**Table 3. Correlation between MRC Score, Myometry Score, demographic data and muscle function tests.**

	MRC Score		Myometry Score	
	Spearman test	Correlation coefficient	Spearman test	Correlation coefficient
Demographic data				
Gender	0.009	0.441	0.01	0.553
Age at MRI	0.015	-0.414	0.049	-0.351
Time from onset of symptoms	0.018	-0.404	0.012	-0.437
Delay from onset to ERT	0.158		0.384	
Functional tests				
Time to walk 10 meters	0.0001	0.803	0.0001	0.722
6MWT	0.0001	0.708	0.0001	0.642
Time to up&go	0.083	-0.322	0.487	-0.132
Time to climb up 4 stairs	0.0001	-0.810	0.0001	-0.630
Time to go down 4 stairs	0.0001	-0.770	0.0001	-0.664
MFM-20	0.0001	0.803	0.0001	0.722
Daily live activities and Quality of life scales				
Activlim	0.0001	0.860	0.0001	0.726
SF-36	0.017	0.448	0.002	0.579
INQoL	0.001	-0.587	0.001	-0.633
Respiratory tests				
CVF seated	0.012	0.454	0.469	0.140
CVF lying	0.05	0.498	0.666	0.121
MIP	0.246	-0.308	0.254	-0.314
MEP	0.149	-0.392	0.670	0.125

Table 3 shows correlation between MRC Score and myometry score with demographic data, muscle function tests and daily live activities.

doi:10.1371/journal.pone.0163493.t003

abdominal muscles (*rectus abdominis*, *obliquus internus*, *obliquus externus*, *transversus abdominalis*), tongue, and *adductor major* muscles.

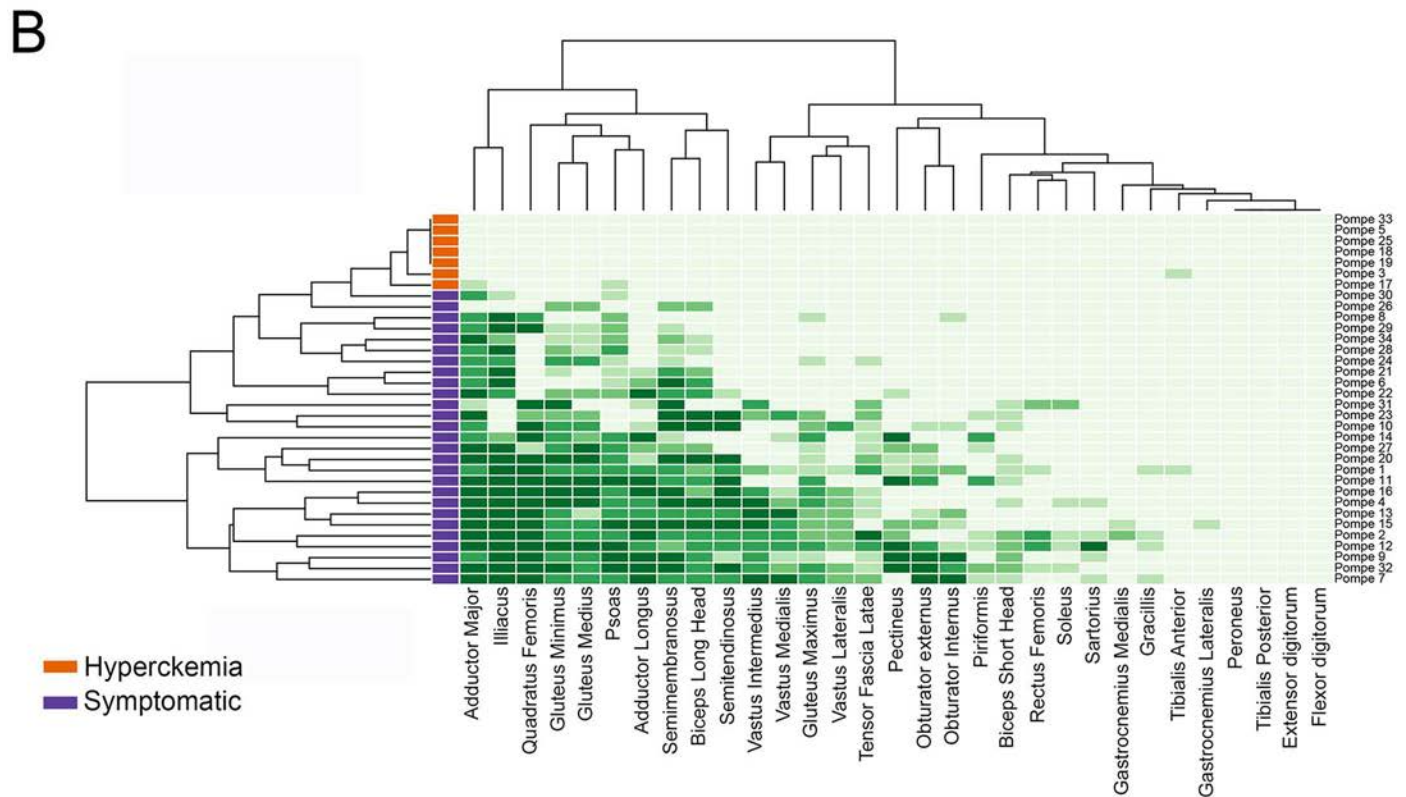
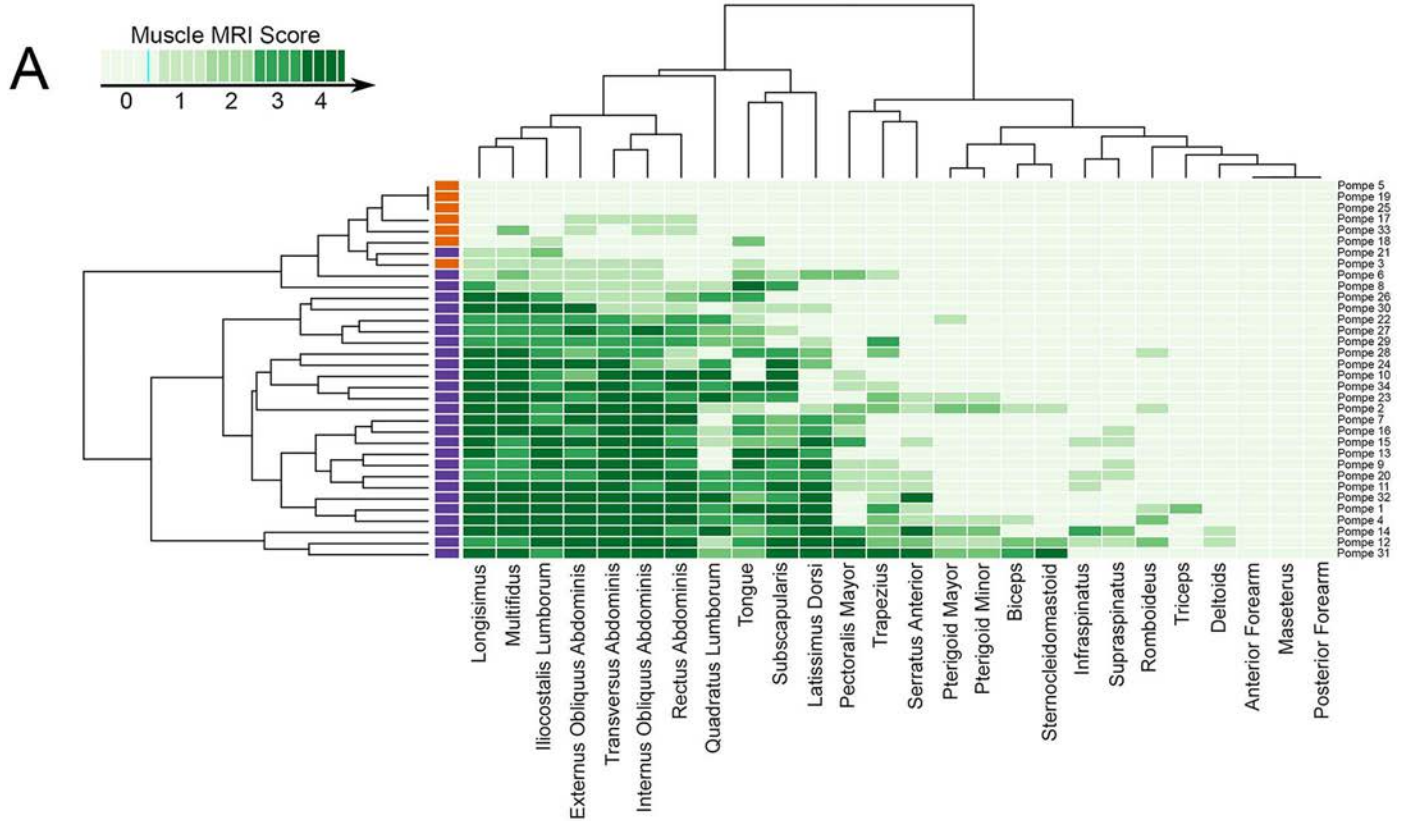
### Muscle MRI analysis: 3-point Dixon imaging.

We analyzed twelve muscles of the thighs and four muscles of the trunk. Fig 4A summarizes the results, showing significant differences in fatty infiltration of muscles between symptomatic and hyperCKemia patients (Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ). S1 Fig shows an example of a 3-point Dixon analysis of thighs. The degree of muscle involvement in symptomatic patients varied from severe, as in *Adductor Major* (median fat fraction 78.05%) to mild involvement as in *Rectus femoris* (median fat fraction 13.46%) (S1 Table). Fatty substitution of paraspinal muscles (*multifidus*, *longissimus* and *iliocostalis*) was very high in symptomatic patients, reaching more than 80% in 19/27 symptomatic patients, and was also detectable in hyperCKemia patients (median fat fraction of 22.26%). There was a strong correlation between Mercuri scores detected using T1w imaging and fat fraction analyzed using 3-point Dixon images (Fig 4D).

### Correlation between muscle function tests and muscle MRI

Correlations between myometry measures and fat infiltration in appropriately tested muscles were similar for 3-point Dixon and for T1w imaging (S2 Table). For example, correlation between knee flexion strength and “hamstring average fat fraction” (the average of fatty



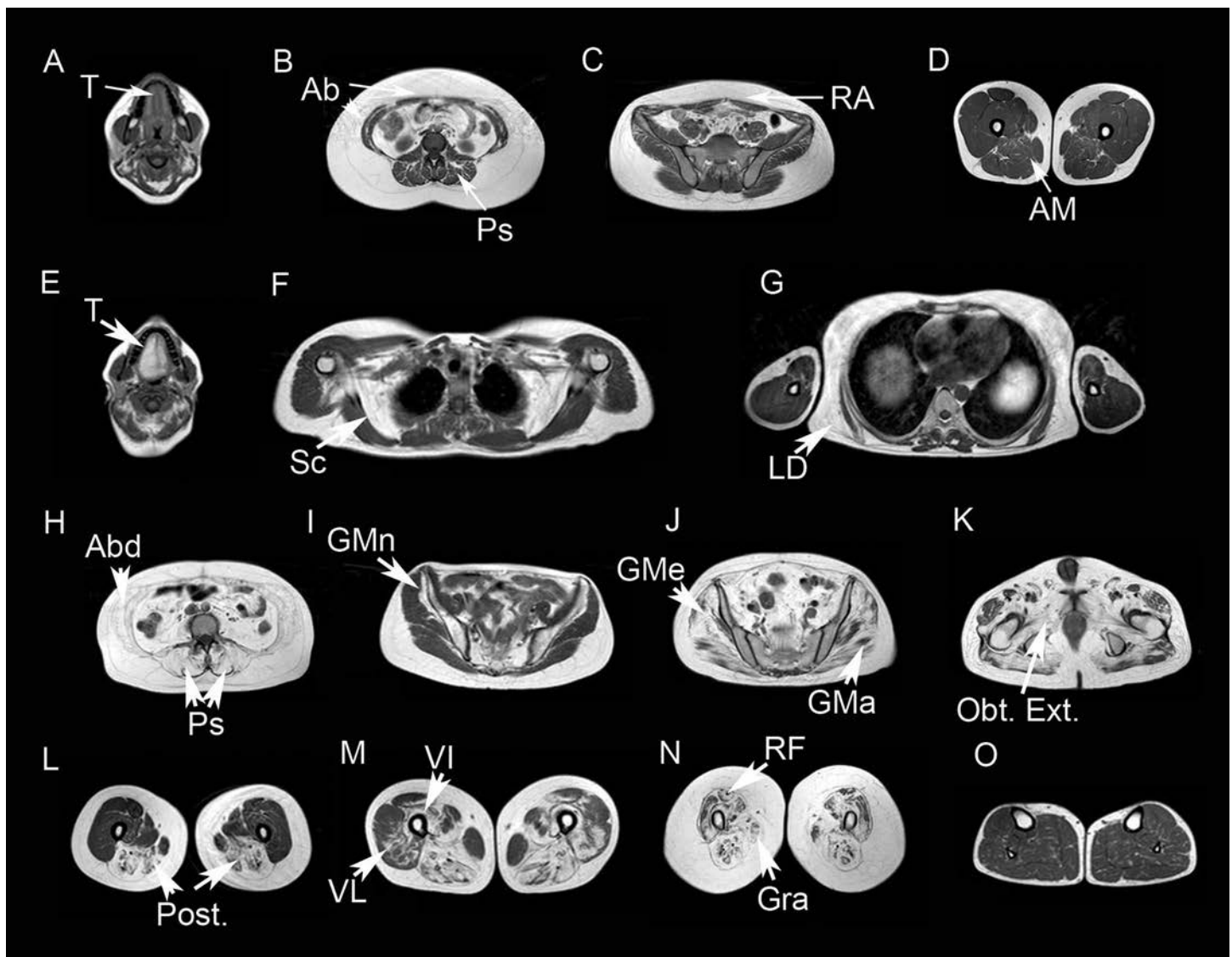


**Fig 2. Representation of score of muscle infiltration observed in T1 imaging in each muscle of every patient by heatmaps.** (A) Heatmap including muscles of the head, upper limbs and trunk. (B) Heatmap including muscles of the pelvis and lower limbs. In each heatmap, patients (rows) are ordered according to hierarchical clustering with increasing grading in infiltration severity from the top to the bottom. Muscles (columns) are ordered according to dendrogram (upper part of the figures). The score of a muscle in a patient is indicated by the colour of the square in the interaction between the patient and that muscle. The darker the square, the more intense the fatty infiltration of that muscle is.

doi:10.1371/journal.pone.0163493.g002

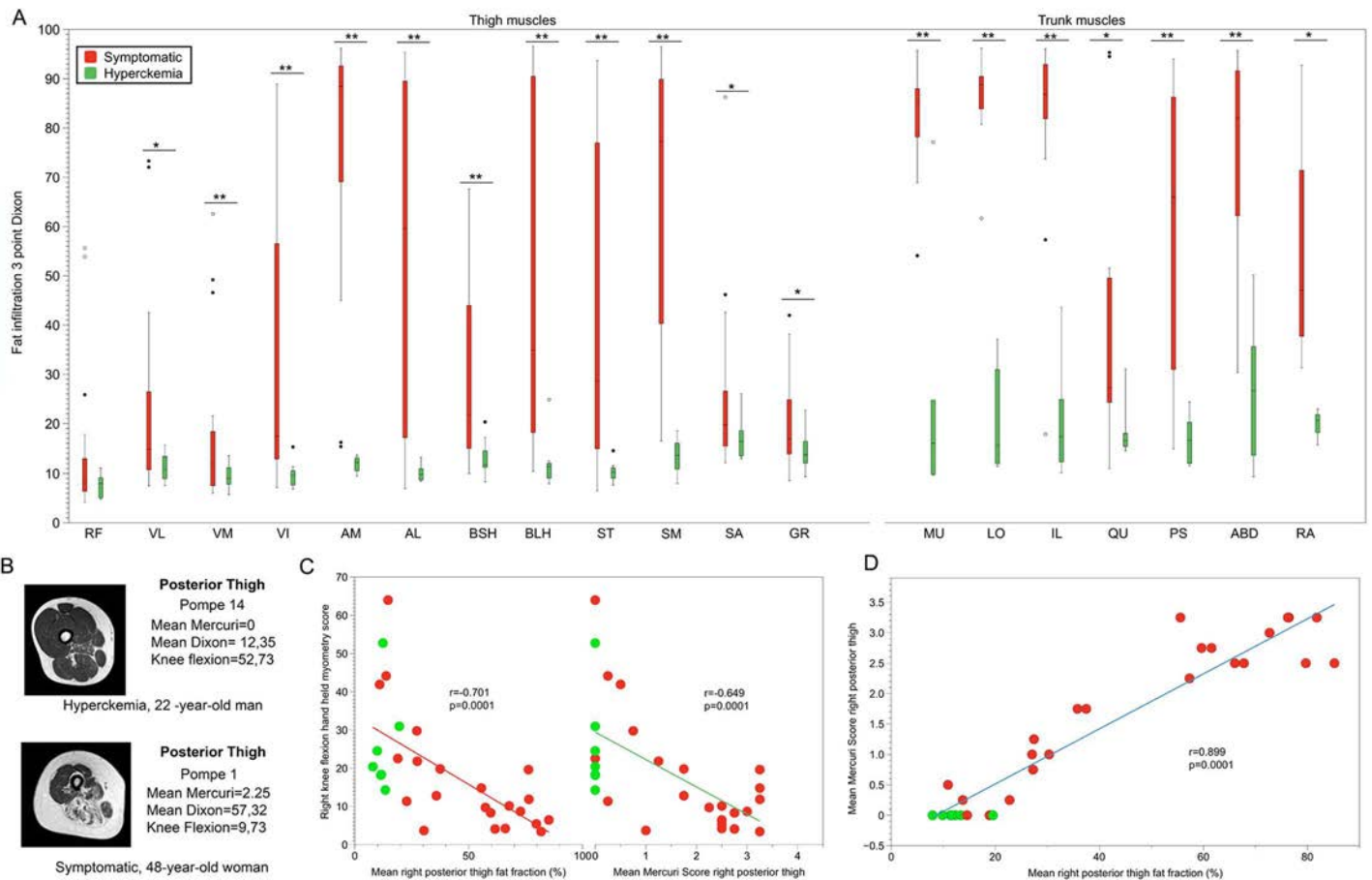
infiltration in *semimembranosus*, *semitendinosus*, *biceps long* and *short head* muscles) for 3-point Dixon imaging was  $\rho = -0.70$ , while for T1w imaging, was  $r = -0.649$  (Fig 4D).

We developed a muscle MRI-T1w score that was the sum of values of the Mercuri scale for each muscle. The mean MRI score was 6 (range: 0 to 15 points) in hyperCKemia patients and



**Fig 3. T1w Muscle MRI of patients with Pompe disease.** We observed mild fatty infiltration in muscles of hyperCKemia patients: Tongue (Tin A), paraspinal muscles (Ps in B), lateral abdominal muscles (Ab in B) and *rectus abdominis* (RA in C) and in *adductor major* muscles (AM in D). The fatty infiltration in symptomatic patients was more evident (E-L). The muscles more commonly involved were tongue (T in E), *subscapularis* (Sc in F), *latissimus dorsi* (LD in G), the abdominal (Ab in H) and paraspinal muscles (Ps in H), the *Gluteus minor* (GMn in I), *medius* (GMe in J) and *maximus* (GMa in J), the muscles of the pelvic floor such as the *Externus Obturator* (Obt. Ext. in K), the posterior muscles of the thighs (Post. in L), and the vasti muscles including *vastus intermedius* (VI in M) and *vastus lateralis* (VL in M). We observed involvement of *rectus femoris* and *gracilis* in advanced patients (RF and Gra in N). Muscles of the lower legs were commonly spared (O).

doi:10.1371/journal.pone.0163493.g003



**Fig 4. Analysis of fatty infiltration in muscle MRIs.** (A) We observed significant differences in the percentage of fatty infiltration quantified using 3-point Dixon technique in most of the muscles between symptomatic (red bars) and hyperckemia patients (green bars). We compared both groups using the Student T test (single asterisk for differences with  $p < 0.05$  and double asterisk for differences with  $p < 0.01$ ). (B) Fat-fraction maps of the right thigh in a hyperckemia and a symptomatic AOPD patient. We show the quantification of the fatty involvement of the thighs using the mean Mercuri Score and the mean 3 point Dixon score (*Semitendinosus*, *Semimembranosus*, *Biceps Long Head* and *Biceps Short Head*). Pompe 14 patients (hyperckemia patient) had higher strength in knee flexion measured with the myometer than patient 1 (symptomatic patient). We observed predominant fatty infiltration in the posterior muscles of the thighs producing decreased strength in the knee flexion test. (C) There was a strong correlation between knee flexion strength and the degree of muscle fatty infiltration calculated both using 3-point Dixon (left) and the Mercuri scale (right). Green dots showed values of hyperckemia patients, while red ones represent values of symptomatic patients. (D) We found a strong correlation between 3 point Dixon analysis and Mercuri score. We have represented the correlation between the quantification of fat infiltration using the mean Mercuri score and the mean 3-point Dixon score of the posterior thigh muscles (*Semitendinosus*, *Semimembranosus*, *Biceps Long Head* and *Biceps Short Head*). RF: *rectus femoris*; VL: *vastus lateralis*; VM: *vastus medialis*; VI: *vastus intermedius*; AM: *adductor major*; AL: *adductor longus*; BSH: *biceps short head*; BLH: *biceps long head*; ST: *semitendinosus*; SM: *semimembranosus*; SA: *sartorius*; GR: *gracilis*; MU: *multifidus*; LO: *longissimus*; IL: *iliocostalis*; QU: *quadratus femoris*; PS: *psaos*; ABD: *lateral abdominal muscles*; RA: *rectus abdominis*.

doi:10.1371/journal.pone.0163493.g004

125.9 (range: 39 to 210 points) in symptomatic patients (Table 2). These differences reached statistical significance (Mann-Whitney U,  $p < 0.001$ ). We found strong correlation between muscle MRI-T1w score and most of the functional muscle tests, such as MRC score, 6MWT, MFM-20 or Activlim scale (Table 4). In contrast, we did not find a good correlation with respiratory tests results or quality of life scales (SF-36 and INQoL). Fig 5 shows 3 examples of correlation between Muscle MRI and functional tests.

We also found strong correlation between the average fat fraction of thigh measured using 3-point Dixon imaging and functional scales (Table 4). In most of the cases, correlation coefficients were higher for 3-point Dixon studies than for T1w imaging. For instance, the correlation coefficient between 6MWT (main test used in clinical trials) and 3-point Dixon tests was  $\rho$

**Table 4. Comparison among MRI score and 3-point Dixon correlations with demographic data and muscle function tests.**

	T1w-MRI Score		3-point Dixon (Average Thigh)	
	SpearmanTest	Correlation coef@cient	Spearman Test	Correlation coef@cient
Demographic data				
Gender	0.069	-0.315	0.019	-0.456
Age at MRI	0.055	0.381	0.022	0.391
Time from onset of symptoms	0.257	0.231	0.043	0.349
Delay from onset to ERT	0.421	-0.224	0.498	-0.152
Functional tests				
Myometry Score	0.001	-0.560	0.0001	-0.633
6MWT	0.001	-0.610	0.0001	-0.764
Time to up&go	0.097	0.308	0.006	0.515
Time to climb up 4 stairs	0.0001	-0.782	0.0001	0.858
Time to go down 4 stairs	0.0001	-0.737	0.0001	0.810
MFM-20	0.0001	0.693	0.0001	-0.681
Daily live activities and Quality of life scales				
Activlim	0.0001	0.785	0.0001	-0.754
Respiratory tests				
FVC seated	0.035	-0.386	0.018	-0.469
FVC lying	0.08	-0.450	0.055	-0.544
PIM	0.356	0.247	0.40	0.253
PEM	0.541	-0.171	0.6	-0.16

doi:10.1371/journal.pone.0163493.t004

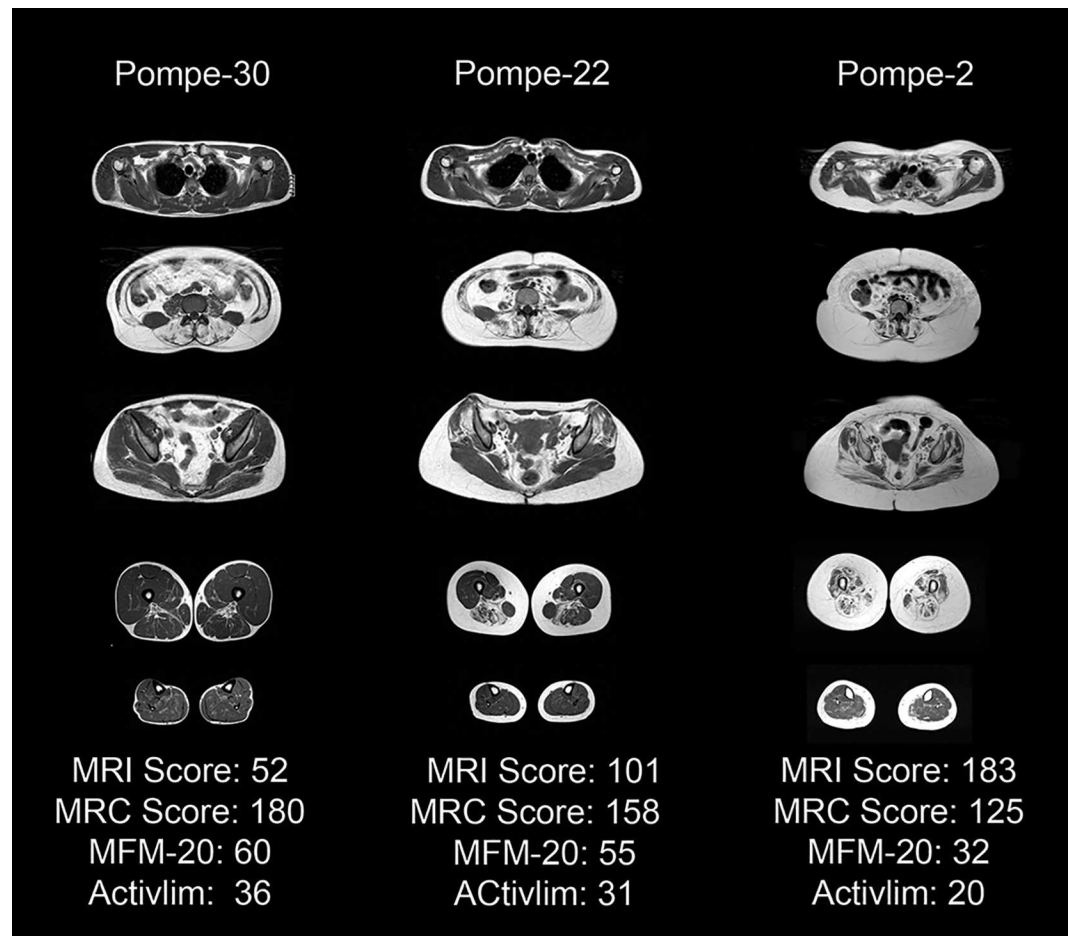
= -0.764 while it was lower for T1w imaging,  $r = -0.610$ . There was no correlation between 3-point Dixon studies and results of respiratory studies.

We analyzed the group of hyperCKemia patients in detail. We found mild changes in muscle MRI in four out of seven cases using T1w imaging that were statistically significant (Mann-Whitney U test,  $p = 0.008$ ). HyperCKemia patients with changes in MRI were older than 20 years old, whereas patients with no changes were younger than 15 years old. 3-point Dixon analysis showed statistically significant differences in the amount of muscle fatty infiltration of the paraspinal muscles in hyperCKemia patients older than 20 years when they were compared with patients younger than 15 years old (Table 5). In contrast, functional scales were similar in both groups.

## Discussion

In the present paper we demonstrate that muscle MRI is a useful tool for the study of patients with AOPD for several reasons. Muscle MRI efficiently identifies a group of atrophic muscles that corresponds to the weakest muscles in clinical examination. Muscle MRI has a good correlation with results of the functional muscle scales commonly used in clinical trials. Additionally, muscle MRI has sensitivity to detect early fat infiltration in patients with hyperCKemia before functional scales are impaired. Based on our results, muscle MRI is an acceptable tool to investigate muscle function status in patients with AOPD.

MRI imaging is progressively gaining widespread use to study patients with muscle diseases [14]. There are sequences available to study several aspects of muscle structure. Carlier et al showed the striking utility of using whole-body T1w imaging in a group of twenty AOPD patients, revealing bright signals as indicators of fat replacement in some specific muscles [21]. This technique facilitates pattern recognition when diagnosis is not clear [22]. However, quantification of fatty infiltration using T1w imaging is based usually in visual semiquantitative



**Fig 5. Correlation between Muscle MRI and Functional scales.** Patient 30 is a 43 years old man with mild infiltration of pelvic and lower limbs muscles with minor functional impairment. Patient 22 is a 40 years old lady with moderate involvement of trunk, pelvic and thighs muscles. She was able to perform most of her daily live activities with no major problems but her clinical examination showed moderate weakness of pelvic muscles. Patient 2 is a 48 years old lady with a severe involvement of muscle producing severe weakness and notably impairing her daily live activities.

doi:10.1371/journal.pone.0163493.g005

scales that are observer dependent. On the other hand, analysis of 3-point Dixon images is performed using software that quantifies the exact amount of fat per pixel. Thus, 3-point Dixon is more accurate than T1w imaging to detect slight changes in fatty infiltration. For this reason, 3-point Dixon could be potentially useful in clinical trials of patients with AOPD, in which fatty infiltration slowly progresses over time.

Nevertheless, to consider muscle MRI findings as a reliable outcome measure, it should also correlate with relevant patient function tests[23]. We show strong correlations between muscle MRI results and several functional scales commonly used in clinical trials such as MRC, time to walk 10 meters or the Activlim scale. We detected a significant correlation between muscle strength measured using hand held myometry and muscle fat fraction. Accordingly MRI provides evidence of muscle damage that correlate strongly with muscle strength and function that are independent of participant effort. This fact is especially important in patients with AOPD in whom 6 MWT has been used as the main functional test to analyze response to treatment. 6MWT is not only dependent on muscle strength, but is also influenced by many other factors such as dyspnea and muscle pain, therefore in our opinion, it analyzes general endurance. In

**Table 5. Comparison between presymptomatic patients with hyperckemia depending on the results of the MRI.**

	Normal MRI (n = 3)	Abnormal MRI (n = 4)	Mann-Whitney
Age (y)	11	29.2	0.073
MRC Score	180	179.2	0.243
Myometry Score (Nm)	261.24	308.49	0.695
6MWT (min)	616	577	0.572
Time to walk 10 meters (sec)	3.0	3.3	0.571
Time to climb up 4 stairs (sec)	1.4	1.5	0.677
Time to go down 4 stairs (sec)	1.3	1.5	0.455
Time to up&go (sec)	4.8	3.1	0.204
MFM-20	57.6	59.2	0.471
Activlim	36	36	1
T1w-MRI Score	0	10.5	0.008
3-point Dixon Fat fraction Thighs (%)	11.93	11.58	0.865
3-point Dixon Fat fraction Paraspinal muscles (%)	13.54	33.43	0.039

doi:10.1371/journal.pone.0163493.t005

fact, we have found a good correlation between muscle MRI and 6MWT. Moreover, the correlation between muscle MRI and muscle strength was strong. Muscle groups that were found atrophic in muscle MRI were the ones weak in MRC study. Heatmaps analyzing MRC (Fig 1) and muscle MRI are practically overlapping (Fig 2). Based on our results, muscle MRI offers a valid and consistent surrogate measure of muscle function. The group of Hovarth studied 7 Pompe patients and 11 controls, using whole-body proton-density fat-fraction imaging[24]. They reported a great sensitivity of MRI to detect subtle changes in skeletal muscles and a good correlation between muscle MRI results and muscle strength analyzed using MRC scale. Our study, which contains a larger number of patients, a more detailed physical examination, a comparison between quantitative and qualitative MRI sequences, and a shorter MRI protocol time (no more than 45 min), confirms their results.

Muscle MRI is also able to identify early changes in muscle signal of several neuromuscular disorders. We observed signs of muscle fatty infiltration in 4 out of 7 patients without any clinical symptom of muscle weakness. Clinical examination, functional and respiratory tests were all normal in these patients. In contrast, muscle MRI already revealed subtle changes, preferentially involving paraspinal and abdominal muscles, suggesting that the process of muscle degeneration had started. A recent retrospective study in a small cohort of AOPD patients analyzing muscle MRI of lower limbs in four asymptomatic patients showed a remarkable increase in fat infiltration of *Adductor magnus* muscle and mild changes in the remaining thigh muscles in one pre-symptomatic patient, suggesting that progressive fatty muscle infiltration starts before clinical manifestations[21]. However, the authors only used T1w imaging to determine mean gray values, which is not a quantitative technique. We have used 3-point Dixon sequences which calculate the exact percentage of fat in every muscle[25]. Moreover, we have analyzed muscle function in detail using several different tests demonstrating the lack of symptoms in patients with isolated hyperCKemia and therefore strengthening our results. In our opinion, detection of a progressive increase in the amount of fatty infiltration in skeletal muscles could potentially be taken into account before deciding to start ERT treatment in a patient with clinically asymptomatic AOPD. Although it is not know how much fatty infiltration in a single muscle is needed to produce weakness, it seems clear that the process of muscle fatty degeneration is not reversible once the treatment is started[26, 27]. Based on our results, it makes sense to follow-up AOPD patients with repeated muscle MRIs, especially those with asymptomatic hyperCKemia. Analysis of paraspinal and abdominal area is crucial to detect

changes and to determine whether fatty involvement of muscles progress[28]. We have already described the early involvement of paraspinal muscles in AOPD patients, which can sometimes present as a pure axial myopathy[28]. In this sense, 3-point Dixon imaging technique has emerged as a powerful tool, superior to T1w imaging, to detect subtle changes in percentage of muscle fatty infiltration in skeletal muscles[29]. Other quantitative sequences, such as quantitative T2-mapping, also showed a better profile than T1-weighted imaging to determine minimal changes in AOPD progression[30]. Although our aim was not to analyze disease progression, those results reinforce the need to improve our knowledge and use of new quantitative techniques.

In the last years several groups have started using quantitative MRI sequences to follow-up AOPD patients. However, these new quantitative techniques have some drawbacks: they are not available in many of the medical centers, they need specific software for quantification and the acquisition and analysis of the images consume a lot of time. In order to surpass these limitations, some authors have quantified fat tissue in skeletal muscles of T1w images using imaging software. For example, the group of Dr. Pichiechio followed-up 9 AOPD patients for six-months and the group of Dr. Kley analyzed muscle MRI of 7 AOPD using this technology[31, 32]. Although they were able to identify changes in fat tissue present in the muscles, it has reported than 3-point Dixon is more precise and reliable than T1w analysis for evaluation of fat fractions in longitudinal follow-up studies of patients with neuromuscular disorders[29]. We are currently conducting a prospective study of a large cohort of AOPD patients using 3-point Dixon as a tool in patient follow-up. We hope this new study will further support the usefulness of MRI for routine clinical practice.

In conclusion, muscle MRI is a reliable, valid and surrogate biomarker of muscle function in patients with AOPD. Muscle MRI is not only useful for diagnosis but also may be useful to predict muscle function in these patients. Furthermore, muscle MRI visualizes fatty muscle infiltration in asymptomatic Pompe patients before functional tests are impaired and potentially help to decide when ERT treatment should be started. Based on our observations, we consider muscle MRI could be used as a complementary test in clinical trials and in daily clinics of patients with AOPD.

## Supporting Information

**S1 Fig. Examples of Fat fraction estimation.** (A) Muscles of the thighs can be clearly identified in a single slice. (B) Selection of the region of interest (ROI) in the *vastus lateralis* muscle for the analysis of fat fraction that in this case is of 23.1%. (C) Paraspinal muscles can be identified in a single slice. (D) Selection of the region of interest (ROI) in the *multifidus* muscle for the analysis of fat fraction that in this case is of 21%.

(TIF)

**S1 Materials. Muscles studied using Fischer modified Mercuri Scale and 3 point Dixon.**

(DOC)

**S1 Table. Quantification of fatty muscle infiltration using 3-point Dixon imaging.** Quantification of fatty muscle infiltration in muscles of thighs and trunk in symptomatic AOPD patients and patients with hyperckemia only. Student T test was used to compare both groups of patients. P values lower than 0.05 were considered significant.

(DOCX)

**S2 Table. Comparison of the correlation between quantification of fatty involvement analyzed using T1 imaging and 3-point Dixon with muscle strength in appropriately tested muscles.** We correlated the strength of the thighs muscles with the degree of fatty infiltration in muscles analyzed using T1w and 3-point Dixon imaging. We correlated hip flexion with

fatty infiltration of psoas muscle, hip adduction with an average of fatty infiltration of *adductor longus* and major, knee extension with the average of fatty infiltration of *rectus femoris*, *vastus medialis*, *vastus intermedius* and *vastus lateralis*; and knee flexion with the average of fatty infiltration of *semitendinosus*, *semimembranosus*, *biceps long head* and *biceps short head*. (DOCX)

## Acknowledgments

We would like to thank the Spanish Association of Patients with Glycogenosis ([www.glucogenosis.org](http://www.glucogenosis.org)) for their support to our investigation. We thank Carolyn Newey for editorial support and Ignasi Gich for support with statistics. We thank Javier Sanchez González and Paula Montesinos Suarez de la Vega from Philips HealthCare Iberia and Dr. Antoni Capdevila for the technical support with the MRI. We thank the MRI whole technician team Esther Alemany, Nieves Campillos, Elisenda Mestres, Eugenia Torres, Ricard Cullell, Alberto Fernández and Mario González for their patience and support with the study. We thank Lidia Gonzalez Quereda, from the Genetic department of Sant Pau Hospital, for reviewing genetic studies of all patients. We also thank Mrs. Concepción Escolá for her assistance during the visits of the study. This study was supported with a grant by GENZYME and a Grant from the Spanish Ministry of Health, FISS PI15/01822 to Dr. Jordi Díaz Manera.

Coinvestigators—The Spanish Pompe Study Group:

Miguel Angel Barba-Romero MD (Hospital General de Albacete, Albacete, Spain)

Joseba Barcena MD (Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Spain)

Pilar Carbonell MD (Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain)

María Rosario Carzorla MD (Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain)

Carlota Creus MD (Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain)

Jaume Coll-Cantí MD, PhD (Hospital Germans Tries i Pujol, Badalona, Spain)

Manuel Díaz MD (Hospital de Cabueñes, Gijón, Spain)

Cristina Domínguez MD (Hospital 12 de Octubre, Madrid & Instituto de Investigación i+12, Madrid, Spain)

Roberto Fernández Torrón MD (Hospital Universitario Donostia, Spain)

María José García Antelo MD (Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain)

Josep Maria Grau MD PhD (Hospital Clínic, Barcelona, Spain)

Adolfo López de Munáin MD PhD (Hospital Universitario Donostia, Spain)

Francisco Antonio Martínez-García MD (Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain)

Yolanda Morgado, MD (Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla, Spain)

Antonio Moreno MD (Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia, Spain)

Germán Morís, MD (Hospital Universitario de Asturias, Oviedo, Spain)

Miguel Angel Muñoz-Blanco MD (Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain)

Andres Nascimento MD (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain)

José Luis Parajuá Pozo MD (Hospital de Can Mises, Ibiza, Spain)

Arturo Robledo-Strauss MD (Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain)

Íñigo Rojas-Marcos MD (Hospital Virgen de Macarena, Sevilla, Spain)

Jose António Salazar MD (Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain)

Mercedes Usón MD (Hospital de Son Llátzer, Palma de Mallorca, Spain)

## Author Contributions

**Conceptualization:** SFB JL II JDM.



**Data curation:** SFB SS AA JDM.

**Formal analysis:** SFB SS IB IP AA MM GSC JDM.

**Funding acquisition:** II JDM.

**Investigation:** SFB SS IB IP AA MM GSC.

**Methodology:** SFB JL JDM.

**Project administration:** SS.

**Resources:** II JDM.

**Software:** SFB JL JDM.

**Supervision:** II EG JL JDM.

**Validation:** SFB EG II JDM.

**Visualization:** SFB JDM.

**Writing – original draft:** SFB EG II JL JDM.

**Writing – review & editing:** SFB EG SS II JL JDM.

## References

1. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet*. 2008; 372(9646):1342±53. doi: [10.1016/S0140-6736\(08\)61555-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61555-X) PMID: [18929906](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18929906/).
2. Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen E, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2006; 86(12):1208±20. doi: [10.1038/labinvest.3700484](https://doi.org/10.1038/labinvest.3700484) PMID: [17075580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17075580/).
3. Bembi B, Cerini E, Danesino C, Donati MA, Gasperini S, Morandi L, et al. Diagnosis of glycosgenosis type II. *Neurology*. 2008; 71(23 Suppl 2):S4±11. doi: [10.1212/WNL.0b013e31818da91e](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31818da91e) PMID: [19047572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19047572/).
4. Gungor D, Kruijshaar ME, Plug I, Rizopoulos D, Kanters TA, Wens SC, et al. Quality of life and participation in daily life of adults with Pompe disease receiving enzyme replacement therapy: 10 years of international follow-up. *Journal of inherited metabolic disease*. 2015. doi: [10.1007/s10545-015-9889-6](https://doi.org/10.1007/s10545-015-9889-6) PMID: [26531313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26531313/).
5. van der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, Escolar DM, Florence J, Groeneveld GJ, et al. A randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease. *The New England journal of medicine*. 2010; 362(15):1396±406. doi: [10.1056/NEJMoa0909859](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909859) PMID: [20393176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20393176/).
6. van der Ploeg AT, Barohn R, Carlson L, Charrow J, Clemens PR, Hopkin RJ, et al. Open-label extension study following the Late-Onset Treatment Study (LOTS) of alglucosidase alfa. *Molecular genetics and metabolism*. 2012; 107(3):456±61. doi: [10.1016/j.ymgme.2012.09.015](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.09.015) PMID: [23031366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23031366/).
7. Toscano A, Schoser B. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: a systematic literature review. *Journal of neurology*. 2013; 260(4):951±9. doi: [10.1007/s00415-012-6636-x](https://doi.org/10.1007/s00415-012-6636-x) PMID: [22926164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22926164/).
8. Wyatt K, Henley W, Anderson L, Anderson R, Nikolaou V, Stein K, et al. The effectiveness and cost-effectiveness of enzyme and substrate replacement therapies: a longitudinal cohort study of people with lysosomal storage disorders. *Health technology assessment*. 2012; 16(39):1±543. doi: [10.3310/hta16390](https://doi.org/10.3310/hta16390) PMID: [23089251](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23089251/).
9. Barba-Romero MA, Barrot E, Bautista-Lorite J, Gutierrez-Rivas E, Illa I, Jimenez LM, et al. Clinical guidelines for late-onset Pompe disease. *Revista de neurologia*. 2012; 54(8):497±507. PMID: [22492103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22492103/).
10. Gutierrez-Rivas E, Illa I, Pascual-Pascual SI, Perez-Lopez J, Vilchez-Padilla JJ, Bautista-Lorite J, et al. [Guidelines for monitoring late-onset Pompe disease]. *Revista de neurologia*. 2015; 60(7):321±8. PMID: [25806482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25806482/).

11. Cupler EJ, Berger KI, Leshner RT, Wolfe GI, Han JJ, Barohn RJ, et al. Consensus treatment recommendations for late-onset Pompe disease. *Muscle & nerve*. 2012; 45(3):319±33. doi: [10.1002/mus.22329](https://doi.org/10.1002/mus.22329) PMID: [22173792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22173792/); PubMed Central PMCID: PMC3534745.
12. Mercuri E, Pichiecchio A, Allsop J, Messina S, Pane M, Muntoni F. Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: past, present, and future. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 2007; 25(2):433±40. doi: [10.1002/jmri.20804](https://doi.org/10.1002/jmri.20804) PMID: [17260395](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17260395/).
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. doi: [10.1212/WNL.0b013e3181ea1564](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ea1564) PMID: [20574037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20574037/).
14. Hollingsworth KG. Quantitative MRI in muscular dystrophy: An indispensable trial endpoint? *Neurology*. 2014; 83(11):956±7. doi: [10.1212/WNL.0000000000000785](https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000785) PMID: [25098536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25098536/).
15. Straub V, Carlier PG, Mercuri E. TREAT-NMD workshop: pattern recognition in genetic muscle diseases using muscle MRI: 25±26 February 2011, Rome, Italy. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2012; 22 Suppl 2:S42±53. doi: [10.1016/j.nmd.2012.08.002](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.08.002) PMID: [22980768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22980768/).
16. Udd B. Distal myopathies—new genetic entities expand diagnostic challenge. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2012; 22(1):5±12. doi: [10.1016/j.nmd.2011.10.003](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.10.003) PMID: [22197426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22197426/).
17. Morrow JM, Sinclair CD, Fischmann A, Machado PM, Reilly MM, Yousry TA, et al. MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *The Lancet Neurology*. 2016; 15(1):65±77. doi: [10.1016/S1474-4422\(15\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00242-2) PMID: [26549782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26549782/); PubMed Central PMCID: PMC4672173.
18. Wary C, Azzabou N, Giraudeau C, Le Louer J, Montus M, Voit T, et al. Quantitative NMRI and NMRS identify augmented disease progression after loss of ambulation in forearms of boys with Duchenne muscular dystrophy. *NMR in biomedicine*. 2015; 28(9):1150±62. doi: [10.1002/nbm.3352](https://doi.org/10.1002/nbm.3352) PMID: [26215733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26215733/).
19. Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K, et al. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurology*. 2008; 71(10):758±65. doi: [10.1212/01.wnl.0000324927.28817.9b](https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000324927.28817.9b) PMID: [18765652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18765652/); PubMed Central PMCID: PMC2583436.
20. Diaz-Manera J, Alejandre A, Gonzalez L, Olive M, Gomez-Andres D, Muelas N, et al. Muscle imaging in muscle dystrophies produced by mutations in the EMD and LMNA genes. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2015. doi: [10.1016/j.nmd.2015.10.001](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.10.001) PMID: [26573435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26573435/).
21. Carlier RY, Laforet P, Wary C, Mompoin D, Laloui K, Pellegrini N, et al. Whole-body muscle MRI in 20 patients suffering from late onset Pompe disease: Involvement patterns. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2011; 21(11):791±9. doi: [10.1016/j.nmd.2011.06.748](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.06.748) PMID: [21803581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21803581/).
22. Diaz-Manera J, Llauger J, Gallardo E, Illa I. Muscle MRI in muscular dystrophies. *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*. 2015; 34(2±3):95±108. PMID: [27199536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27199536/); PubMed Central PMCID: PMC4859076.
23. Bonati U, Hafner P, Schadelin S, Schmid M, Naduvilekoot Devasia A, Schroeder J, et al. Quantitative muscle MRI: A powerful surrogate outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2015; 25(9):679±85. doi: [10.1016/j.nmd.2015.05.006](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.05.006) PMID: [26096788](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26096788/).
24. Horvath JJ, Austin SL, Case LE, Greene KB, Jones HN, Soher BJ, et al. Correlation between quantitative whole-body muscle magnetic resonance imaging and clinical muscle weakness in Pompe disease. *Muscle & nerve*. 2015; 51(5):722±30. doi: [10.1002/mus.24437](https://doi.org/10.1002/mus.24437) PMID: [25155446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25155446/).
25. Ma J. Dixon techniques for water and fat imaging. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 2008; 28(3):543±58. doi: [10.1002/jmri.21492](https://doi.org/10.1002/jmri.21492) PMID: [18777528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18777528/).
26. Ravaglia S, Pichiecchio A, Ponzio M, Danesino C, Saeidi Garaghani K, Poloni GU, et al. Changes in skeletal muscle qualities during enzyme replacement therapy in late-onset type II glycogenosis: temporal and spatial pattern of mass vs. strength response. *Journal of inherited metabolic disease*. 2010; 33(6):737±45. doi: [10.1007/s10545-010-9204-5](https://doi.org/10.1007/s10545-010-9204-5) PMID: [20844963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20844963/).
27. Arpan I, Willcocks RJ, Forbes SC, Finkel RS, Lott DJ, Rooney WD, et al. Examination of effects of corticosteroids on skeletal muscles of boys with DMD using MRI and MRS. *Neurology*. 2014; 83(11):974±80. doi: [10.1212/WNL.0000000000000775](https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000775) PMID: [25098537](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25098537/); PubMed Central PMCID: PMC4162304.
28. Alejandre A, Diaz-Manera J, Ravaglia S, Tibaldi EC, D'Amore F, Moris G, et al. Trunk muscle involvement in late-onset Pompe disease: study of thirty patients. *Neuromuscular disorders: NMD*. 2012; 22 Suppl 2:S148±54. doi: [10.1016/j.nmd.2012.05.011](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.05.011) PMID: [22980766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22980766/).
29. Wokke BH, Bos C, Reijniere M, van Rijswijk CS, Eggers H, Webb A, et al. Comparison of dixon and T1-weighted MR methods to assess the degree of fat infiltration in duchenne muscular dystrophy patients. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*. 2013; 38(3):619±24. doi: [10.1002/jmri.23998](https://doi.org/10.1002/jmri.23998) PMID: [23292884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23292884/).

30. Carlier PG, Azzabou N, de Sousa PL, Hicks A, Boisserie JM, Amadon A, et al. Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging follow-up of adult Pompe patients. *Journal of inherited metabolic disease*. 2015; 38(3):565±72. doi: [10.1007/s10545-015-9825-9](https://doi.org/10.1007/s10545-015-9825-9) PMID: [25749708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25749708/); PubMed Central PMCID: PMC4432102.
31. Pichiecchio A, Poloni GU, Ravaglia S, Ponzio M, Germani G, Maranzana D, et al. Enzyme replacement therapy in adult-onset glycogenosis II: is quantitative muscle MRI helpful? *Muscle & nerve*. 2009; 40(1):122±5. doi: [10.1002/mus.21304](https://doi.org/10.1002/mus.21304) PMID: [19533640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19533640/).
32. Gruhn KM, Heyer CM, Guttsches AK, Rehmann R, Nicolas V, Schmidt-Wilcke T, et al. Muscle imaging data in late-onset Pompe disease reveal a correlation between the pre-existing degree of lipomatous muscle alterations and the efficacy of long-term enzyme replacement therapy. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2015; 3:58±64. doi: [10.1016/j.ymgmr.2015.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2015.03.010) PMID: [26937398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26937398/); PubMed Central PMCID: PMC4750633.



1 **Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: a prospective**  
2 **study.**

3

4 Sebastian Figuroa-Bonaparte<sup>1</sup>; Jaume Llauger<sup>3</sup>; Sonia Segovia<sup>1,2</sup>; Izaskun Belmonte<sup>4</sup>;  
5 Irene Pedrosa<sup>4</sup>; Elena Montiel<sup>4</sup>; Paula Montesinos<sup>5</sup>; Javier Sánchez-González<sup>5</sup>; Alicia  
6 Alonso-Jiménez<sup>1</sup>; Eduard Gallardo<sup>1,2</sup>; Isabel Illa<sup>1,2</sup>; Spanish Pompe group and Jordi  
7 Díaz-Manera<sup>1,2</sup>.

8

9 1. Neuromuscular Disorders Unit. Neurology Department. Hospital de la Santa  
10 Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona. Spain.

11 2. Centro de Investigación en Red en Enfermedades Raras (CIBERER).

12 3. Radiology department. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat  
13 Autònoma de Barcelona. Spain.

14 4. Rehabilitation and physiotherapy department. Hospital de la Santa Creu i Sant  
15 Pau. Universitat Autònoma de Barcelona. Spain.

16 5. Philips Healthcare Iberia, Madrid, Spain

17

18 **Corresponding author:** Jordi Díaz-Manera, Neuromuscular disorders Unit, Hospital de

19 la Santa Creu I Sant Pau. Sant Antoni M<sup>a</sup> Claret 167; Barcelona 08025, Spain. Tel.:

20 +34-935565986. Fax: +34-935565602. Email: [jdiazm@santpau.cat](mailto:jdiazm@santpau.cat).

21

22

23

**1 ABSTRACT**

2 Late onset Pompe disease (LOPD) is a slow, progressive disorder characterized by  
3 skeletal and respiratory muscle weakness. Enzyme replacement therapy (ERT) slows  
4 down the progression of muscle symptoms. Reliable biomarkers are needed to follow  
5 up ERT-treated and asymptomatic LOPD patients in clinical practice. In this study, 32  
6 LOPD patients (22 symptomatic and 10 asymptomatic) underwent muscle MRI using 3-  
7 point Dixon and were evaluated at the time of the MRI with several motor function tests  
8 and patient-reported outcome measures, and again after one year. Muscle MRI showed  
9 a significant increase of 1.7% in the fat content of the thigh muscles in symptomatic  
10 LOPD patients. In contrast, there were no noteworthy differences between muscle  
11 function tests in the same period of time. We did not observe any significant changes  
12 either in muscle MRI or in muscle function tests in asymptomatic patients over the year.  
13 We conclude that 3-point Dixon muscle MRI is a useful tool for detecting changes in  
14 muscle structure in symptomatic LOPD patients and could become part of the current  
15 follow-up protocol in daily clinics.

16

## 1 INTRODUCTION

2 Pompe disease is a genetic disorder characterized by glycogen accumulation in all  
3 tissues of the body [1]. Pompe patients are classified as infantile or late onset (LOPD)  
4 depending on their age when symptoms first appear. LOPD patients have variable  
5 clinical presentations, ranging from asymptomatic hyperCKemia to limb girdle and  
6 respiratory muscle weakness [2]. Enzymatic replacement therapy (ERT) is indicated for  
7 LOPD patients with skeletal muscle weakness and/or respiratory involvement [3].  
8 Several studies have reported motor and respiratory stabilization during the first few  
9 years of ERT, and even a decrease in the mortality rate [4-9]. However, it has been  
10 suggested that ERT does not stop muscle degeneration at the histological level [10].  
11 Indeed, recently published data have shown impairment in muscle and respiratory  
12 function after several years of treatment [11].

13  
14 In following up asymptomatic LOPD patients, the main aim is to detect changes in  
15 muscle function that could support ERT treatment. However, normal muscle function  
16 tests do not reveal the integrity of the muscle structure of these patients; muscle fiber  
17 loss and fatty replacement could have started without yet influencing the results of the  
18 tests. Moreover, it is questionable whether muscle function tests are precise enough to  
19 detect subtle changes, and most authors agree that we need reliable non-invasive  
20 biomarkers of disease progression [12, 13].

21  
22 Quantitative muscle MRI (qMRI) has emerged as a valuable biomarker to follow up the  
23 progression of neuromuscular disorders [14-18]. qMRI is a non-invasive tool that  
24 quantifies the amount of fat present in a muscle's region of interest (ROI). The total  
25 muscle area and remaining muscle tissue can also be calculated [16, 17]. We have

1 previously demonstrated that qMRI correlates strongly with common outcome measures  
2 used in LOPD [19]. Our main aim was to investigate MRI changes occurring in the  
3 muscles of LOPD patients and assess whether qMRI was more sensitive to changes  
4 after one year than other commonly used motor function tests or patient-reported  
5 outcome measures (PROMs).  
6



1 **RESULTS**

2 **Description of the cohort**

3 We recruited 32 late onset Pompe disease (LOPD) patients for this study. They were  
 4 classified as symptomatic or asymptomatic depending on the presence of weakness at  
 5 clinical examination. Twenty-two patients were symptomatic and treated with ERT  
 6 while ten were non-symptomatic and only had hyperCKemia. This second group was  
 7 studied in neuromuscular disorder units because high levels of CKs were found in  
 8 routine blood tests (7 cases) or because they had relatives already diagnosed with  
 9 Pompe disease (3 cases). Clinical and genetic data of the patients included in the study  
 10 are described in tables 1 and 2. We found two pathogenic mutations in all our patients,  
 11 except for patient 29. That patient, in absence of defined GAA variants, was diagnosed  
 12 by biochemical results as GAA deficiency in leucocytes with the values of 0.03  
 13 nmol/min/mg protein (normal values: 0.15-1 nmol/min/mg protein) and confirmed in  
 14 fibroblasts with the value of 21.4 nmol/min/mg protein (normal values 400-600  
 15 nmol/min/mg protein).

16

N	Gender	Age at study (y)	Phenotype	Mut 1	Mut 2	CK (U/l)	ERT	Age at ERT	Wheelchair dependent	Respiratory support
1	Female	50	Proximal weakness LL + axial	IVS1-13T>G	c.1076-1G>C	251	Yes	47	N	N
2	Female	48	Proximal weakness UL and LL + axial + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.2173C>T	779	Yes	39	Y	NIV
3	Female	26	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	720	No	-	N	N
4	Female	63	Proximal	IVS1-13T>G	c.2600_2604	311	Yes	59	N	N

			weakness LL + axial		delinsA						
5	Male	11	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.573>A	276	No	-	N	N	
6	Female	45	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1532C>A	322	Yes	42	N	N	
7	Female	51	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.236_246del	240	Yes	47	N	N	
8	Female	59	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1637A>G	341	Yes	52	N	N	
9	Female	55	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.2173C>T	359	Yes	48	N	N	
10	Male	42	Proximal weakness LL + axial + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.573C>A	606	Yes	39	N	NIV	
11	Female	31	Proximal weakness UL and LL + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.1637A>G	391	Yes	24	Y	IV	
12	Male	47	Proximal weakness LL + respiratory insufficiency	c.2173C>T	c.2173C>T	508	Yes	45	N	NIV	
13	Male	51	Proximal weakness LL + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.1657C>T	709	Yes	45	N	NIV	
14	Female	51	Proximal weakness UL and LL + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.1657C>T	458	Yes	46	N	NIV	
15	Male	22	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1781G>A	126 8	No	-	N	N	

16	Male	49	HyperCKemia	c.271G>A	c.2510G>A	641	No	-	N	N
17	Male	14	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.573C>A	660	No	-	N	N
18	Female	65	Proximal weakness LL + respiratory insufficiency	c.1781G>A	c.1194+5G>A	68	Yes	64	N	N
19	Female	35	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1A>T	355	Yes	29	N	N
20	Female	40	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	831	Yes	-	N	NIV
21	Female	52	Proximal weakness LL + respiratory insufficiency	c.1781G>A	c.1194+5G>A	907	Yes	45	N	N
22	Male	64	Proximal weakness UL + LL + axial + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.2481+102_2646+31del	430	Yes	57	N	NIV
23	Male	8	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	1077	No	-	N	N
24	Female	57	Proximal weakness LL + respiratory insufficiency	IVS1-13T>G	c.1447G>T	394	Yes	55	N	NIV
25	Male	46	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1532C>A	882	Yes	43	N	NIV
26	Male	51	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1933G>T	952	Yes	51	N	NIV
27	Male	51	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1933G>T	432	No	-	N	N
28	Male	43	Proximal weakness LL	IVS1-13T>G	c.1408_1410delinsTTT	317	Yes	43	N	N
29	Female	54	Proximal UL and axial weakness	*Not found	*Not found	275	Yes	48	N	N

30	Female	20	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c. 1551+1G>A	928	No	-	N	N
31	Male	50	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c. 1551+1 G>A	250	No	-	N	N
32	Female	36	HyperCKemia	IVS1-13T>G	IVS1- 13T>G	230	No	-	N	N

1 **Table 1:** Clinical characteristics of the cohort of LOPD patients participating in the  
2 study. Normal CK levels were lower than 170 U/L. Patients 13 and 14 and patients  
3 26 and 27 were siblings. Respiratory support: NIV means non-invasive ventilation  
4 while IV means invasive ventilation. UL: Upper limbs, LL: lower limbs, Y: yes, N: No.  
5

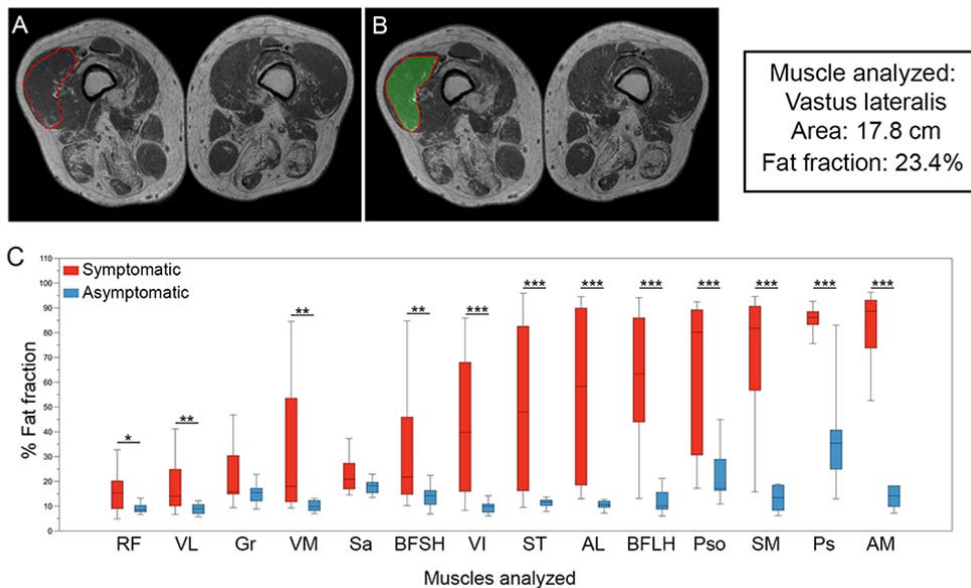
	Patients		
	ERT treated	HyperCKemia	p*
Number of patients	22	10	
Gender (W)	15, 68.2%	3, 30%	0.06*
Age at baseline	51 (45-55)	24 (13.5-49.5)	0.04
Time from onset of symptoms	15 (11-22)	-	
Time on ERT	4(2-7)	-	
Walking aids	10	-	
Ventilation	11	-	
Time to walk 10 meters (s)	7.1 (5.3-8.8)	3.1 (2.7-3.4)	0.001
6 MWT (m)	414.5 (306.2-493.2)	603 (535.2-677.7)	0.0001
Time to climb 4 steps (s)	3.4 (2.3-6.5)	1.5 (1.2-1.9)	0.005
Time to descend 4 steps (s)	2.8 (2.1-4.8)	1.4 (1.1-1.6)	0.007
Timed up & go test (s)	5.7 (3.1-7.9)	4 (2.9-5.4)	0.03
MRC	96 (84-106)	120 (118-120)	0.0001
Myometry	141 (101-231)	342 (215-491)	0.02
MFM-20 (score)	47.5 (43.5-55)	59.5 (57.5-60)	0.0001
CVF seated (%)	79.9 (60.2-88.7)	92 (85.8-103)	0.03

CVF lying (%)	68.5 (39.5-81.7)	85.5 (77.5-92.2)	0.02
Activlim (score)	21 (18-26)	18 (18-24)	>0.05
SF36 (score)	56.9 (43.7-69.9)	85.5 (69-90)	0.02
INQoL (score)	39 (23.5-53.9)	2.5 (0.9-18.1)	0.05

1 **Table 2:** Demographic and clinical data of symptomatic and asymptomatic Pompe  
 2 patients included in the study. Median value and 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles are shown for  
 3 every variable. S: seconds, m: meters.

4  
 5 **Baseline Muscle MRI and muscle function analysis.**

6 We focused our attention on the trunk and thigh regions because these muscles are the  
 7 most commonly involved in LOPD [19, 20]. Analysis of 3-point Dixon studies showed  
 8 a higher statistical significance for the fat fraction (FF) in symptomatic compared to  
 9 asymptomatic LOPD patients in all analyzed muscles, except for *sartorius* and *gracillis*  
 10 (Figure 1C).



11  
 12 **Figure 1: Analysis of fat fraction in thigh and trunk muscles in LOPD patients at**  
 13 **baseline.** A and B show an example of how ROIs are drawn to obtain total muscle area

1 and fat fraction in 3-point Dixon images. C shows the fat fraction calculated for thigh  
 2 and trunk muscles in symptomatic (red) and asymptomatic (blue) patients. The box plot  
 3 includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile, the mid lines indicate the median, bars are the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup>  
 4 percentiles. \*P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\*P<0.001. RF: *Rectus Femoris*, VL: *Vastus*  
 5 *Lateralis*, Gr: *Gracilis*, VM: *Vastus Medialis*, Sa: *Sartorius*, BFSH: *Biceps Femoris*  
 6 *Short Head*, VI: *Vastus Intermedius*, ST: *Semitendinosus*, AL: *Adductor Longus*, BFLH:  
 7 *Biceps Femoris Long Head*, Pso: *Psoas*, SM: *Semimembranosus*, Ps: *Paraspinalis*, and  
 8 AM: *Adductor Major*.

9  
 10 Thigh FF was significantly higher in symptomatic than asymptomatic patients (Median:  
 11 34.03 vs. 11.07, Mann Whitney U test, p=0.0001). We found strong correlations  
 12 between muscle function tests and average thigh FF at baseline (Table 3). For example,  
 13 thigh FF correlated with the total MRC lower limb score (p=0.0001,  $\rho=-0.89$ ) or  
 14 6MWT results (p=0.0001,  $\rho=-0.68$ ). In contrast, there was a poor correlation between  
 15 thigh FF and respiratory parameters (CVF while seated: p=0.02,  $\rho=-0.4$ ; CVF while  
 16 lying down: p=0.17,  $\rho=-0.34$ ), as well as with the results of the patient-reported  
 17 outcome measures (INQoL: p=0.05,  $\rho=0.37$ ). We did not find a strong correlation  
 18 between thigh FF and clinical parameters such as age at baseline (p=0.03,  $\rho=0.48$ ), time  
 19 from onset of symptoms (p=0.06,  $\rho=0.32$ ), or time on ERT (p=0.013,  $\rho=0.52$ ).

20

Muscle function test	p	Spearman Correlation coefficient
<b>Muscle function tests</b>		
MRC score (all muscles)	0.0001	-0.89
MRC score (lower limbs)	0.0001	-0.91
Myometry score (all muscles)	0.0001	-0.64
Myometry score (lower limbs)	0.0001	-0.65
6MWT	0.0001	-0.68
Time to walk 10 meters	0.0001	0.80
Time to climb 4 steps	0.0001	0.84

Time to descend 4 steps	0.0001	0.75
Timed up & go test	0.021	0.40
MFM-20	0.0001	-0.75
<b>Spirometry</b>		
CVF seated	0.022	-0.40
CVF lying	0.17	
<b>Patient-reported outcomes</b>		
Activlim	0.01	0.43
SF36 total	0.08	
SF36 physical	0.004	-0.53
SF36 mental	0.86	
INQoL	0.05	0.37

1 **Table 3:** Correlation between Thigh fat fraction and muscle function tests,  
 2 spirometry results and patient-reported outcomes at baseline visit. Spearman test  
 3 was used to study whether there was a significant correlation between variables.  
 4 Adjustment for multiple comparisons using Bonferroni correction was applied; p  
 5 was considered significant if lower than 0.003.

6  
 7 **One year muscle MRI and muscle function analysis**

8 We repeated muscle function tests, spirometry, patient-reported outcome measures and  
 9 muscle MRI for all patients after one year. In symptomatic patients, muscle function  
 10 tests, spirometry and patient-reported outcomes did not show significant changes from  
 11 baseline to year 1 (Table 4). In contrast, 3-point Dixon images detected a median  
 12 increase of 1.7% in thigh FF that was statistically significant (paired Wilcoxon signed  
 13 rank test, p=0.001) (Figure 2). Changes in FF between baseline and year 1 for  
 14 individual muscles are specified in Table 5.

15

	Symptomatic treated patients (baseline vs. 12-month follow-up) (n=22)	P value	Asymptomatic patients (baseline vs. 12-month follow-up) (n=10)	P value
Muscle function tests				
<b>MRC total, score</b>	0 (-4;+6)	0.79	0 (0;+1)	0.31
<b>MRC Lower</b>	0 (-5;+4)	0.54	0 (0)	0.31

<b>limbs, score</b>				
<b>Knee extension (Nm)</b>	10.74 (0;+20.44)	0.19	-0.96 (-18.11;+3.15)	0.40
<b>Knee flexion (Nm)</b>	1.84 (-1.26;+5.97)	0.20	-0.51 (-10.13;+6.43)	0.67
<b>Hip flexion (Nm)</b>	3.97 (-1.7;+9.84)	0.14	-0.75 (-15.1;+3.9)	0.40
<b>Hip extension (Nm)</b>	2 (-0.13;+5.47)	0.08	-4.15 (-16.04;+1.82)	0.40
<b>6-MWT, m</b>	0 (-9.5;+11)	0.96	10 (-24.7;+7.5)	0.48
<b>Time to walk 10 m, seconds</b>	0(-1.44;+0.4)	0.43	-0.1(-2.52;+0.32)	0.91
<b>Time to climb 4 steps, seconds</b>	0 (-0.42;+0.5)	0.77	-0.1 (-0.32; 0)	0.39
<b>Time to descend 4 steps, seconds</b>	0 (-0.35;+1.32)	0.43	-0.05 (-0.12;+0.1)	0.55
<b>Timed up &amp; go test, sec</b>	0.6 (-0.4;+5.2)	0.47	-0.15 (-0.72;+0.97)	0.94
<b>MFM-20, score</b>	0 (-2;+2)	0.63	0 (0;+1)	0.33
Respiratory studies				
<b>CVF seated (%)</b>	-0.3 (-4;+3)	0.24	0 (-6;+5.77)	0.73
<b>CVF lying (%)</b>	0 (-6.2;+7.62)	0.73	9 (-2;+12)	0.13
Muscle MRI				
<b>qMRI Thighs</b>	1.79 (+0.2;+2.4)	<b>0.001</b>	-0.11 (-0.82;+0.4)	0.57
<b>qMRI Paraspinal</b>	-0.03 (-2.23;+0.73)	0.34	0 (-1.25;+1.89)	0.77
Patient-reported outcomes				
<b>Activlim</b>	33 (+1;+59)	0.81	67.5 (+37.5;+70.2)	0.31
<b>SF36</b>	1.8 (+0.67;+10.73)	0.22	3.28 (+24.84;+10.12)	0.89
<b>INQoL</b>	-2.9 (-5.5;+0.73)	0.17	-4.3 (-8.2;+1.1)	0.31

1

2

3

4

5

6

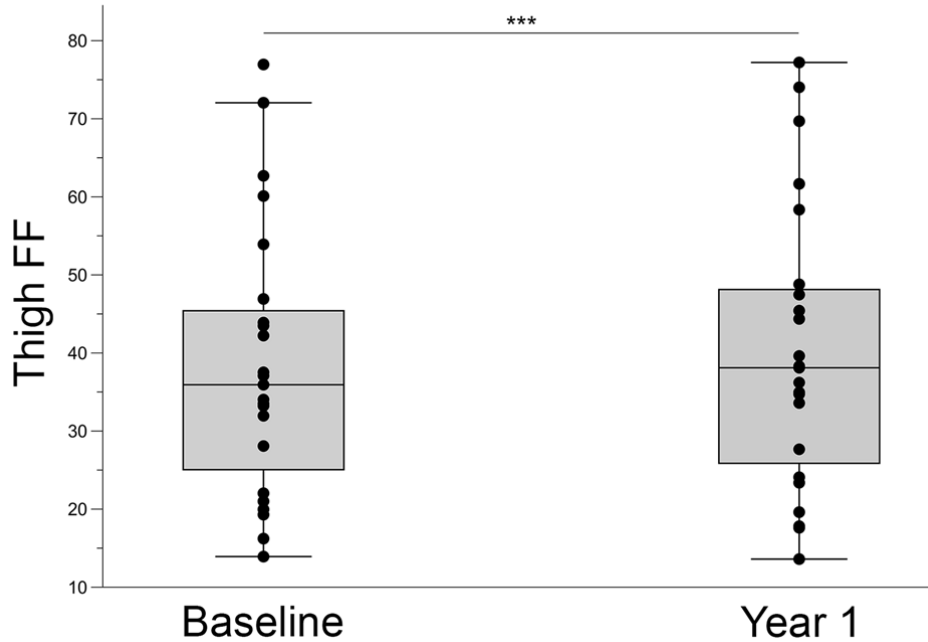
7

8

9

**Table 4:** Change between baseline and year 1 evaluation in muscle function tests, spirometry, quantitative muscle MRI and patient reported outcome measures in symptomatic and asymptomatic LOPD patients. Median value and 25th-75<sup>th</sup> percentiles are shown. Paired Wilcoxon signed rank test was used to find out whether the differences observed between baseline and year 1 evaluation were statistically significant. Adjustment for multiple comparisons using Bonferroni correction was applied; p was considered significant if lower than 0.002.





1  
2  
3  
4  
5  
6  
7

**Figure 2: Yearly progression in thigh muscle fat replacement in symptomatic LOPD patients.** The box plot includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile, the mid lines indicate the median, bars are the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup> percentiles. Each dot represents one symptomatic LOPD patient. Mann-Whitney U Test, \*\*\*P<0.001

	Symptomatic treated patients (baseline vs. 12-month follow-up)	P value	Asymptomatic patients (baseline vs. 12-month follow-up)	P value
<i>Rectus Femoris</i>	0.44 (+0.02;+2.22)	0.04	-1.04 (-1.94-0.19)	0.13
<i>Vastus Lateralis</i>	1.4 (+0.01;+2.99)	0.009	-0.55 (-1.3;+0.22)	0.24
<i>Vastus Medialis</i>	0.22 (-1.04;+2.8)	0.15	0.48 (-1.34;+2.03)	0.44
<i>Vastus Intermedius</i>	1.66 (+0.24;+3.21)	<b>0.001</b>	-0.54 (-1;+0.05)	0.13
<i>Biceps Femoral short head</i>	1.76 (-0.3;+2.78)	0.007	0.01 (-1.23;+2.64)	0.64
<i>Biceps femoral long head</i>	1.2 (-0.2;+3.3)	0.006	0.36 (-0.79;+0.64)	0.64
<i>Adductor Longus</i>	0.04 (-1.6;+1.24)	0.93	-0.2 (-1.62;+1.35)	0.50
<i>Adductor Magnus</i>	0.51 (-0.06;+1.66)	0.053	0.3 (-1.79;+1.03)	0.57
<i>Sartorius</i>	1.03 (-0.85;+2.34)	0.08	-0.97 (-1.38;+1.13)	0.38

<i>Gracillis</i>	-0.11 (-2.44;+1.79)	0.73	-0.71 (-1.79;+0.77)	0.44
<i>Semitendinosus</i>	1.17 (0;+3.22)	0.02	-0.45 (-1.9;+0.77)	0.59
<i>Semimembranosus</i>	0.6 (-0.61;+3.15)	0.10	1.82 (-0.16;+3.21)	0.02
<b>Total thigh</b>	1.79 (+0.2;+2.4)	<b>0.001</b>	-0.11 (-0.82;+0.4)	0.57
<b>Paraspinal</b>	-0.03 (-2.23;+0.73)	0.34	0 (-1.25;+1.89)	0.77
<b>Psoas</b>	0.97 (+0.06;+0.95)	0.02	-0.91 (-3.08;+2.71)	0.67

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

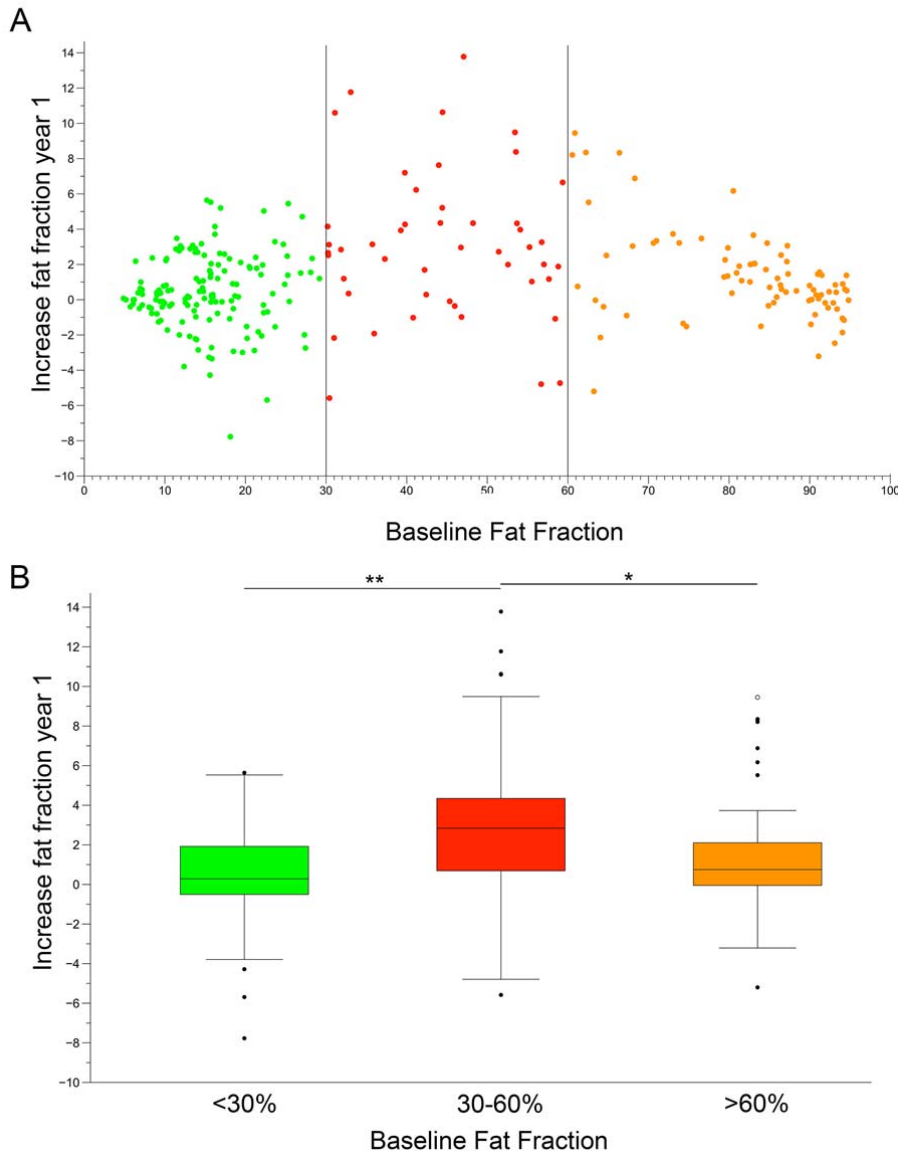
23

24

**Table 5:** Fat fraction progression in every thigh and trunk muscle after one year of follow-up in symptomatic and asymptomatic patients. Median value is shown with 25th-75<sup>th</sup> percentiles in brackets. Paired Wilcoxon signed rank test was used to find out whether the differences observed between baseline and year 1 evaluation were statistically significant. Adjustment for multiple comparisons using Bonferroni correction was applied: p was considered significant if lower than 0.004.

We studied whether demographic or clinical factors such as sex or age at the start of ERT were associated with the increase of thigh FF at year 1. We only found a significant correlation between baseline thigh FF and increase of thigh FF at year 1 (Spearman test  $p=0.024$ ;  $\rho=0.48$ ). The thigh FF value in a single patient is an average value of fat present in muscles at different stages of involvement, from mild involvement to complete fat replacement. It has recently been shown that the basal status of muscles could influence response to treatment and consequently their increase in FF [21]. For this reason, in an exploratory post-hoc analysis, we decided to study all muscles as separate variables. We classified muscles as having mild fatty infiltration when FF at baseline was lower than 30%, moderate infiltration when FF at baseline was between 30 and 60%, and severe infiltration when FF at baseline was higher than 60%. There were significant differences in the increase in FF between the three groups after one year (Kruskal-Wallis,  $p<0.0001$ , Figure 3). We observed that FF in muscles with less than 30% FF at baseline increased less than muscles with FF between 30 and 60%

1 after one year (median +0.28% vs. +2.84%,  $p < 0.0001$ ). In a similar way, FF in muscles  
 2 with more than 60% FF at baseline increased less than muscles with FF between 30 and  
 3 60% during the same period (median +0.75% vs. +2.84%,  $p = 0.004$ ).  
 4  
 5



6  
 7 **Figure 3:** Yearly progression of fat replacement in individual muscles of symptomatic  
 8 patients. A: Each dot represents fat fraction calculated in a single muscle. Vertical lines  
 9 divide muscles based on baseline fat fractions: low (green dots, 0-30%), intermediate

1 (red dots, 30-60%) and severe (orange dots, 60-90%). B: Increase in muscle fat  
2 replacement related to baseline fat fraction. The box plot includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>  
3 percentile, the mid lines indicate the median, bars correspond to the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup> percentiles.

4 Black dots are outliers. Kruskal-Wallis test, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

5

6

7 Muscle FF did not change significantly in asymptomatic LOPD patients. The median  
8 change in thigh FF in this group was -0.11% (Paired Wilcoxon signed rank test,  
9 P=0.57). We did not find significant changes in muscle function tests in this group of  
10 patients after the one year follow-up (Table 4).

11

## 1 **DISCUSSION**

2 In the present study we show that quantitative muscle MRI using 3-point Dixon is a  
3 useful tool for monitoring disease progression in patients with late onset Pompe disease.  
4 qMRI was more sensitive to the changes over a period of one year than other more  
5 conventional muscle tests. We analyzed a large cohort of LOPD patients including  
6 symptomatic treated patients and asymptomatic patients with hyperCKemia. Our  
7 results support the addition of qMRI to the protocol currently used to follow up LOPD  
8 patients. In the case of treated patients, qMRI could be useful for analyzing treatment  
9 response. For asymptomatic patients, meanwhile, an increase in fat infiltration detected  
10 by qMRI, before clinical symptoms are evident, should be taken into account when  
11 considering ERT or a closer follow-up of progression.

12  
13 Hereditary myopathies are characterized by slow progression over the years. Skeletal  
14 muscle is replaced by fat and fibrotic tissue leading to muscle weakness [22]. However,  
15 annual changes in muscle strength and function can be subtle and difficult to quantify,  
16 and it is not uncommon to find a heterogeneous rate of progression among patients. For  
17 these reasons, establishing the progression rate of hereditary myopathies is a difficult  
18 task. This difficulty needs to be addressed, especially at present, when several drugs  
19 designed to slow down the progression of these diseases are being tested in clinical  
20 trials[23]. To keep up with these therapeutic advances, the neuromuscular field needs  
21 reliable biomarkers to detect subtle changes in muscle structure and function [24-26].

22  
23 qMRI has recently been suggested as a useful tool for following up patients with  
24 various neuromuscular diseases [13, 15, 18, 27, 28]. We analyzed the progression of  
25 muscle fat infiltration in patients with LOPD over a period of one year using a qMRI

1 sequence, the 3-point Dixon, which has been reported to be a valuable outcome  
2 measure, reproducible and more sensitive to change after a short period of time than  
3 muscle function tests [17]. Our results agree with this previous observation. However,  
4 in our opinion, 3-point-Dixon has some limitations. Analysis of the images is still  
5 performed by hand as ROIs are manually drawn on muscle sections, making the  
6 evaluation of images a time-consuming task that requires a high degree of expertise and  
7 patience. Software that can automatically calculate fat fraction on an entire slice stack  
8 has been developed, but has not yet been applied to neuromuscular disorders [29]. As  
9 fat infiltration is not homogeneous through all the muscle, several slices should be  
10 analyzed to calculate median fat infiltration. Moreover, the analysis of a new set of  
11 images obtained from the same patients after a period of time requires internal anatomic  
12 landmarks to facilitate the recognition of slices that were previously quantified.

13

14 This is the largest prospective study using qMRI in LOPD patients reported so far. We  
15 analyzed 22 LOPD patients treated with ERT in a wide range of clinical situations, from  
16 wheelchair-bound patients requiring ventilation, to patients with slight weakness and no  
17 major problems in daily activities [30, 31]. Two reports including longitudinal data of  
18 qMRI imaging from LOPD patients have already been published. Dr. Carlier and  
19 collaborators performed a retrospective analysis of 14 LOPD patients treated with ERT  
20 and found a significant increase of 0.9% in FF of all lower limb muscles during a one  
21 year period [32]. The EMBASSY study provided follow-up data for 16 LOPD patients  
22 using muscle function tests or repeated muscle biopsies [33]. Five of the 16 patients  
23 were also followed up using qMRI which included 3-point Dixon. After six months, a  
24 mean increase of 0.6% in FF of all leg muscles was observed. However, both studies  
25 analyzed lower leg muscles, such as *tibialis anterior* or *soleus*, that are commonly less

1 involved in LOPD, probably reducing the final average increase in FF observed [19,  
2 20].

3

4 Our study also adds new information about the natural progression of pathology in  
5 Pompe disease. 3-point Dixon imaging quantifies fat infiltration in skeletal muscles,  
6 which is a common pathological change observed in neuromuscular disorders. In the  
7 case of LOPD, the earliest pathological change is the accumulation of glycogen inside  
8 lysosomes in the sarcoplasm [34]. The progressive addition of lysosomes has two  
9 consequences. On the one hand, there is dysfunction in the contractile properties of the  
10 myofiber. On the other, the cellular autophagy process is impaired, leading to an  
11 accumulation of debris inside the muscle fiber [35-37]. Eventually, the muscle fiber  
12 degenerates and dies, and is replaced by fat, which is detectable using muscle MRI.

13 ERT has been shown to reduce the accumulation of glycogen in the sarcoplasm and  
14 reactivate cellular autophagy, reducing muscle fiber loss [37]. We therefore argue that  
15 3-point Dixon could be useful in following up the progression of muscle fiber loss and  
16 fatty replacement in LOPD, which is the final consequence of glycogen accumulation in  
17 lysosomes. However, 3-point Dixon imaging does not identify glycogen, which would  
18 be very useful in following up asymptomatic patients for whom muscle fiber necrosis  
19 has probably just started or is minimal [38]. MRI sequences to detect glycogen in  
20 human tissue have been developed, including  $(^{13}\text{C})$ -MR spectroscopy, chemical  
21 exchange saturation transfer imaging or proton MRS. However, this technology is not  
22 routinely available on standard clinical scanners [39]. MRI sequences commonly used  
23 in clinical centers include T1, 3-point Dixon, T2 and STIR [40]. An increase in the  
24 STIR signal in muscles from LOPD patients has recently been described, with the  
25 suggestion that this is related to the presence of water molecules retained by glycogen

1 [41]. Nevertheless, this increase was not detected in all Pompe patients. In a similar  
2 way, an increased T2 signal has been described in some muscles in Pompe patients [32].  
3 Although the increase in STIR signal has been related to accumulation of water or  
4 edema, the increase in T2 signal is not specific and can be observed in muscle fiber  
5 necrosis, inflammation, or presence of free water [42, 43]. We therefore still need MRI  
6 sequences capable of identifying glycogen that can be used in clinical settings, and  
7 future research should focus on this area.

8  
9 We detected an average increase in FF of 1.7% in symptomatic ERT treated patients  
10 after one year of follow-up. In contrast, no functional changes were observed in the  
11 same period of time. The increase in FF detected in ERT-treated patients is probably not  
12 enough to produce a functional change. However, the progressive increase of FF could  
13 result in a deterioration of muscle function after several years, as has been recently  
14 described in patients treated with ERT for more than 5 years [11]. It would be very  
15 valuable to identify the ratio of FF increase in non-treated symptomatic LOPD patients.

16 One of the limitations of this study is that we had no control group including  
17 symptomatic non-treated patients, because ERT usually starts soon after patients  
18 develop muscle symptoms.

19  
20 The factors that could influence the response of LOPD to ERT are still not known. The  
21 majority of muscles had a slow, continuous progression despite ERT treatment, which is  
22 reminiscent of that observed in other slow, progressive muscular dystrophies. We  
23 observed that those muscles which were less infiltrated at the basal evaluation were the  
24 ones that progressed the least. This finding has also been reported by other groups  
25 studying Pompe disease. In our opinion, this may be due to the fact that in muscles with



1 a certain degree of degeneration, autophagic vacuoles accumulate, impairing the  
2 transport of the enzyme from the sarcolemma to the lysosomes and probably reducing  
3 the effect of ERT [35-37]. However, this rate of progression has also been described in  
4 patients with facioscapulohumeral muscle dystrophy [28], suggesting that a certain  
5 amount of baseline damage in skeletal muscles can be associated with a more rapid  
6 progression of the disease. If this were confirmed, early treatment of patients could  
7 result in a better and longer-lasting response to drugs, although this should be further  
8 investigated in a prospective clinical trial [21, 37]. In any case, we think qMRI may  
9 play an important role in the early detection of fatty infiltration in muscle, which would  
10 suggest following up asymptomatic patients more closely.

11

12 Based on our results, we conclude that qMRI is a very efficient tool for demonstrating  
13 the muscular condition of Pompe patients from the morphological point of view, and to  
14 monitor symptomatic and asymptomatic LOPD patients treated or not with ERT in daily  
15 clinics. However, its utility in detecting muscle degeneration in short therapeutic trials  
16 may be questionable.

17

18

## 1 **METHODS**

### 2 **Study design and participants**

3 We are conducting a prospective observational study following up LOPD patients at the  
4 Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) in Barcelona. This comprises annual  
5 evaluations, including muscle function tests, spirometry, quality of life scales and  
6 quantitative muscle MRI. This study is registered in ClinicalTrials.gov with the  
7 identifier NCT01914536. The HSCSP ethics committee approved the study and all  
8 participants signed an informed consent form. All study procedures were performed in  
9 accordance with Spanish regulations.

10 Inclusion criteria for the study were: 1) Diagnosis of LOPD based on recommendations  
11 recently proposed by the European Pompe Consortium; reduced enzymatic activity in  
12 leukocytes, fibroblasts or skeletal muscle and/or the presence of two mutations in the  
13 *GAA* gene following the diagnostic [44]; 2) No contraindications to MRI; 3) Symptoms  
14 of muscle weakness starting after the age of 18; 4) Willingness to complete all muscle  
15 function tests, respiratory assessment and patient-reported outcomes measures.

16

17 All patients were studied by two physiotherapists (I.B. and I.P.) with considerable  
18 experience in neuromuscular disorders at HSCSP in Barcelona. The physiotherapists  
19 evaluated muscle function using the following tests: the 6 minute walking test, time to  
20 walk 10 meters, timed up-and-go test, time to climb up and down 4 steps, and the motor  
21 function measure-20 item scale (MFM-20) [45]. Muscle strength was studied using both  
22 the Muscle Research Council scale (MRC) and hand-held myometry. ACTIVLIM,  
23 INQoL and SF-36 were used as patient-reported outcome measures [46]. We obtained  
24 forced vital capacity, both seated and lying down, using the Carefusion Microlab ML  
25 3500 MK8 spirometer (Carefusion, Yorba Linda, CA, USA).

1 Patients were classified as symptomatic or asymptomatic. We considered a patient  
2 symptomatic when muscle weakness was found in clinical examination using the MRC  
3 scale, or when Forced Vital Capacity was at less than 85% of the normal values.

4

5

## 6 **Muscle imaging**

7 All patients were examined in a Philips Achieva XR 1.5 Tesla located at HSCSP. We  
8 used the same positioning protocol for all patients: a supine position with the legs  
9 stretched out, the patella facing upwards and the ankles in a neutral position.

10 Axial 3D 3-point Dixon images were acquired with the following acquisition  
11 parameters: TR/TE=5.78/1.8, 4 ms, flip angle=15°, FOV=520x340x300 mm, voxel  
12 size=1x1x3 mm for thighs and FOV=520x320x200 mm and voxel size=1.3x1.7x5 mm  
13 for the lower trunk. The acquisition time was 45 minutes per patient.

14 Two investigators (S.F-B. and J.D-M.) analyzed 3-point Dixon MR images using the  
15 PRIDE (Philips Research Image Development Environment) tool. ROIs were manually  
16 drawn on five slices of the following muscles: *rectus femoris*, *vastus intermedius*, *vastus*  
17 *lateralis*, *vastus medialis*, *adductor magnus*, *sartorius*, *gracilis*, *semitendinosus* and  
18 *semimembranosus*; on three slices of *biceps femoris long head*, *biceps femoris short*  
19 *head* and *adductor longus*; and on two slices for *psoas* and lumbar paraspinal muscles.

20 We used anatomical landmarks to ensure consistency between baseline and year 1  
21 analysis: we took the last slice in which the femoral head was observed as a reference,  
22 and analyzed muscles every 5 cm along the entire thigh.

1 For every ROI, the total area and area covered by fat were calculated automatically  
2 using the PRIDE tool (Figure 1A and B). The fat fraction coefficient was defined as  
3  $\frac{fat}{fat + water}$  where *fat* and *water* were the image intensity values over the ROI for  
4 the fat and water Dixon images respectively. From those two parameters, and assuming  
5 that water content corresponds mainly to muscle, fat and muscle area were estimated.  
6 Accumulative values across all slices were also computed and, as a final index, muscle  
7 Fat Fraction (FF) was calculated as follows:  $FF = (\text{muscle fat area} \times 100) / \text{muscle}$   
8 *area*. Once we obtained the values from every muscle we calculated thigh fat fraction as  
9 follows:  $\text{thigh FF} = (\text{Sum of fat area of all thigh muscles} \times 100) / \text{sum of muscle area of all}$   
10 *thigh muscles*).

11 The average time to quantify fat fraction in 3-point Dixon images was 60 minutes. A  
12 high degree of reliability was found between investigators. The IIC coefficient was  
13 0.982 with a 95% confidence interval from 0.977 to 0.987.

#### 14 **Statistics**

15 We used non-parametric tests for the statistical analysis of the variables. We used the  
16 Mann-Whitney U test to investigate whether there were significant differences between  
17 variables between groups (symptomatic vs. asymptomatic). Agreement between fat  
18 fraction measurements in quantitative muscle MRI, taken by two different investigators,  
19 was measured using the Intraclass Correlation Coefficient (IIC). We used the paired  
20 Wilcoxon signed rank test to investigate whether there were significant changes in  
21 motor function tests, spirometry, quality of life scales and the fat fraction measurements  
22 obtained with qMRI between the baseline and year 1 visit. We used Spearman's rank  
23 correlation (coefficient reported as  $\rho$ ) to investigate whether there was a correlation  
24 between the results of the muscle function tests, spirometry, quality of life scales and

1 the thigh fat fraction obtained using qMRI. As we ran multiple correlations, a  
2 Bonferroni test was performed to avoid type 1 errors. An ROC curve was performed to  
3 study whether thigh fat fraction was able to differentiate between symptomatic and  
4 asymptomatic Pompe patients with high sensitivity and specificity. The results of all  
5 statistical studies were considered significant if P was lower than 0.05. Statistical  
6 studies were performed using IBM SPSS® Statistics software version 21.  
7 The datasets generated during the current study are available from the corresponding  
8 author on reasonable request.  
9

1 **References**

- 2 [1]. Bembi, B. *et al.* Diagnosis of glycogenosis type II. *Neurology*. **71**,S4-11  
3 (2008).
- 4 [2]. Schuller, A., Wenninger, S., Strigl-Pill, N. & Schoser, B. Toward  
5 deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin*  
6 *Med Genet*. **160C**, 80-88 (2012).
- 7 [3]. van der Ploeg, A.T., *et al.* A randomized study of alglucosidase alfa in late-  
8 onset Pompe's disease. *N Engl J Med*. **362**, 1396-1406 (2010).
- 9 [4]. van der Ploeg, A.T. *et al.* Open-label extension study following the Late-  
10 Onset Treatment Study (LOTS) of alglucosidase alfa. *Mol Genet Metab*. **107**, 456-  
11 461 (2012).
- 12 [5]. Gungor, D. *et al.* Impact of enzyme replacement therapy on survival in  
13 adults with Pompe disease: results from a prospective international observational  
14 study. *Orphanet J Rare Dis*. **8**, 49 (2013).
- 15 [6]. Angelini, C. *et al.* Observational clinical study in juvenile-adult glycogenosis  
16 type 2 patients undergoing enzyme replacement therapy for up to 4 years. *J Neurol*.  
17 **259**, 952-958 (2012).
- 18 [7]. Stepien, K.M., Hendriks, C.J., Roberts, M. & Sharma, R. Observational clinical  
19 study of 22 adult-onset Pompe disease patients undergoing enzyme replacement  
20 therapy over 5 years. *Mol Genet Metab*. **117**, 413-418 (2016).
- 21 [8]. de Vries, J.M. *et al.* Effect of enzyme therapy and prognostic factors in 69  
22 adults with Pompe disease: an open-label single-center study. *Orphanet J Rare Dis*.  
23 **7**, 73 (2012).
- 24 [9]. Schoser, B. *et al.* Survival and long-term outcomes in late-onset Pompe  
25 disease following alglucosidase alfa treatment: a systematic review and meta-  
26 analysis. *J Neurol*. **264**, 621-630 (2017).
- 27 [10]. Raben, N. *et al.* Enzyme replacement therapy in the mouse model of Pompe  
28 disease. *Mol Genet Metab*. **80**, 159-169 (2003).
- 29 [11]. Kuperus, E. *et al.* Long-term benefit of enzyme replacement therapy in  
30 Pompe disease: A 5-year prospective study. *Neurology*. **89**, 2365-73 (2017).
- 31 [12]. De Filippi, P. *et al.* Genotype-phenotype correlation in Pompe disease, a step  
32 forward. *Orphanet J Rare Dis*. **9**, 102 (2014).
- 33 [13]. Morrow, J.M. *et al.* MRI biomarker assessment of neuromuscular disease  
34 progression: a prospective observational cohort study. *Lancet Neurol*. **15**, 65-77  
35 (2016).
- 36 [14]. Willcocks, R.J. *et al.* Multicenter prospective longitudinal study of magnetic  
37 resonance biomarkers in a large duchenne muscular dystrophy cohort. *Ann Neurol*.  
38 **79**, 535-547 (2016).
- 39 [15]. Willis, T.A. *et al.* Quantitative magnetic resonance imaging in limb-girdle  
40 muscular dystrophy 2I: a multinational cross-sectional study. *PLoS One*. **9**, e90377  
41 (2014)
- 42 [16]. Lokken, N., Hedermann, G., Thomsen, C. & Vissing, J. Contractile properties  
43 are disrupted in Becker muscular dystrophy, but not in limb girdle type 2I. *Ann*  
44 *Neurol*. **80**, 466-471 (2016).
- 45 [17]. Burakiewicz, J. *et al.* Quantifying fat replacement of muscle by quantitative  
46 MRI in muscular dystrophy. *J Neurol*. **264**, 2053-2067 (2017).

- 1 [18]. Willis, T.A. *et al.* Quantitative muscle MRI as an assessment tool for  
2 monitoring disease progression in LGMD2I: a multicentre longitudinal study. *PLoS*  
3 *One.* **8**,e70993 (2013).
- 4 [19]. Figuroa-Bonaparte, S. *et al.* Muscle MRI Findings in Childhood/Adult Onset  
5 Pompe Disease Correlate with Muscle Function. *PLoS One.* **11**, e0163493 (2016).
- 6 [20]. Carlier, R.Y. *et al.* Whole-body muscle MRI in 20 patients suffering from late  
7 onset Pompe disease: Involvement patterns. *Neuromuscul Disord.* **21**, 791-799  
8 (2011)
- 9 [21]. Gruhn, K.M. *et al.* Muscle imaging data in late-onset Pompe disease reveal a  
10 correlation between the pre-existing degree of lipomatous muscle alterations and  
11 the efficacy of long-term enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab Rep.* **3**, 58-  
12 64 (2015).
- 13 [22]. Wallace, G.Q. & McNally, E.M. Mechanisms of muscle degeneration,  
14 regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol.* **71**, 37-57  
15 (2009).
- 16 [23]. Straub, V. *et al.* Stakeholder cooperation to overcome challenges in orphan  
17 medicine development: the example of Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*  
18 *Neurol.* **15**, 882-890 (2016).
- 19 [24]. Fatehi, F., Salort-Campana, E., Le Troter, A., Bendahan, D. & Attarian, S.  
20 Muscle MRI of facioscapulohumeral dystrophy (FSHD): A growing demand and a  
21 promising approach. *Rev Neurol (Paris).* **172**, 566-571 (2016).
- 22 [25]. Grolez, G. *et al.* The value of magnetic resonance imaging as a biomarker for  
23 amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *BMC Neurol.* **16**, 155 (2016).
- 24 [26]. Straub, V. & Bertoli, M. Where do we stand in trial readiness for autosomal  
25 recessive limb girdle muscular dystrophies? *Neuromuscul Disord.* **26**, 111-125  
26 (2016).
- 27 [27]. Willcocks, R.J. *et al.* Longitudinal measurements of MRI-T2 in boys with  
28 Duchenne muscular dystrophy: effects of age and disease progression.  
29 *Neuromuscul Disord.* **24**, 393-401 (2014).
- 30 [28]. Andersen, G. *et al.* MRI as outcome measure in facioscapulohumeral  
31 muscular dystrophy: 1-year follow-up of 45 patients. *J Neurol.* **264**, 438-447  
32 (2017).
- 33 [29]. Baudin, P.Y., Azzabou, N., Carlier, P.G. & Paragios, N. Prior knowledge,  
34 random walks and human skeletal muscle segmentation. *Med Image Comput*  
35 *Comput Assist Interv.* 2012 **15**, 569-576.
- 36 [30]. Echaniz-Laguna, A. *et al.* Should patients with asymptomatic pompe disease  
37 be treated? A nationwide study in France. *Muscle Nerve.* **51**, 884-889 (2015).
- 38 [31]. Hagemans, M.L. *et al.* Disease severity in children and adults with Pompe  
39 disease related to age and disease duration. *Neurology.* **64**, 2139-2141 (2005).
- 40 [32]. Carlier, P.G. *et al.* Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance  
41 imaging follow-up of adult Pompe patients. *J Inherit Metab Dis.* **38**, 565-572  
42 (2015).
- 43 [33]. van der Ploeg, A. *et al.* Prospective exploratory muscle biopsy, imaging, and  
44 functional assessment in patients with late-onset Pompe disease treated with  
45 alglucosidase alfa: The EMBASSY Study. *Mol Genet Metab.* **119**, 115-123 (2016).
- 46 [34]. Thurberg, B.L. *et al.* Characterization of pre- and post-treatment pathology  
47 after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Invest.* **86**, 1208-1220  
48 (2006).

- 1 [35]. Raben, N., Wong, A., Ralston, E. & Myerowitz, R. Autophagy and  
2 mitochondria in Pompe disease: nothing is so new as what has long been forgotten.  
3 *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* **160C**, 13-21 (2012).
- 4 [36]. Nascimbeni, A.C., Fanin, M., Masiero, E., Angelini, C. & Sandri, M. The role of  
5 autophagy in the pathogenesis of glycogen storage disease type II (GSDII). *Cell*  
6 *Death Differ.* **19**, 1698-1708 (2012).
- 7 [37]. Ripolone, M. *et al.* Effects of short-to-long term enzyme replacement  
8 therapy (ERT) on skeletal muscle tissue in late onset Pompe disease (LOPD).  
9 *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017.
- 10 [38]. Pichiecchio, A. *et al.* Asymptomatic Pompe disease: Can muscle magnetic  
11 resonance imaging facilitate diagnosis? *Muscle Nerve.* **53**, 326-327 (2016).
- 12 [39]. van Zijl, P.C., Jones, C.K., Ren, J., Malloy, C.R. & Sherry, A.D. MRI detection of  
13 glycogen in vivo by using chemical exchange saturation transfer imaging  
14 (glycoCEST). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 4359-4364 (2007).
- 15 [40]. Filli, L., Winklhofer, S., Andreisek, G. & Del Grande, F. Imaging of Myopathies.  
16 *Radiol Clin North Am.* **55**, 1055-1070 (2017).
- 17 [41]. Pichiecchio, A. *et al.* Muscle MRI of classic infantile pompe patients: Fatty  
18 substitution and edema-like changes. *Muscle Nerve.* **55**, 841-848 (2017).
- 19 [42]. Azzabou, N. & Carlier, P.G. Fat quantification and T2 measurement. *Pediatr*  
20 *Radiol.* **44**, 1620-1621 (2014).
- 21 [43]. Kim, H.K. *et al.* Quantitative Skeletal Muscle MRI: Part 2, MR Spectroscopy  
22 and T2 Relaxation Time Mapping-Comparison Between Boys With Duchenne  
23 Muscular Dystrophy and Healthy Boys. *AJR Am J Roentgenol.* **205**, W216-223  
24 (2015).
- 25 [44]. van der Ploeg, A.T. *et al.* European consensus for starting and stopping  
26 enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year  
27 experience. *Eur J Neurol.* **24**, 768-e31 (2017).
- 28 [45]. Harris, E. *et al.* The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy: An  
29 international multicenter study. *Neurol Genet.* **2**, e89 (2016).
- 30 [46]. Vandervelde, L., Van den Bergh, P.Y., Goemans, N. & Thonnard, J.L.  
31 ACTIVLIM: a Rasch-built measure of activity limitations in children and adults with  
32 neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord.* **17**, 459-469 (2007).

33

34



1 **Acknowledgments**

2

3 We would like to thank the Spanish Association of Patients with Glycogenesis (www.

4 glucogenesis.org) for their support for our investigation. We thank Neil McMillan for

5 editorial support and Ignasi Gich for help with statistics. We thank the entire MRI

6 technician team: Esther Alemany, Nieves Campillos, Elisenda Mestres, Eugenia Torres,

7 Ricard Cullell, Ingrid Rubio, Alberto Fernández, and Mario González, for their patience

8 and support for the study. We also thank Mrs. Concepción Escolá for her assistance

9 during the visits of the study. This investigation was sponsored by two grants, one from

10 Sanofi Genzyme and another from the Spanish Ministry of Health, Fondos FEDER-

11 ISCIII PI15/01822 to Dr. Jordi Díaz-Manera.

12

1 **Additional information:**

2

3 **Competing interests:**

4

5 The study was supported by Sanofi-Genzyme. The company did not interfere in the

6 design of the protocol or review any data obtained from patients. There are no

7 other conflicts of interest.

8

9

1 **Author Contributions:**

2 SFB designed the protocol, visited the patients, analyzed muscle MRIs and wrote  
3 the paper.

4 JL designed the protocol and wrote the paper.

5 SS coordinated the study, visited the patients and reviewed the paper.

6 IB, IP and EM designed the protocol, visited the patients and acquired motor  
7 function data.

8 PM and JSG designed the protocol and wrote the paper.

9 AAJ visited the patients and reviewed the paper.

10 II and EG designed and discussed the protocol.

11 JDM designed the protocol, visited the patients, analyzed the images, wrote the  
12 paper and obtained funding for the study.

13

14

1 **Figure legends**

2 **Figure 1: Analysis of fat fraction in thigh and trunk muscles in LOPD patients at**

3 **baseline.** A and B show an example of how ROIs are drawn to obtain total muscle area

4 and fat fraction in 3-point Dixon images. C shows the fat fraction calculated for thigh

5 and trunk muscles in symptomatic (red) and asymptomatic (blue) patients. The box plot

6 includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile, the mid lines indicate the median, bars are the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup>

7 percentiles. \*P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\*P<0.001. RF: *Rectus Femoris*, VL: *Vastus*

8 *Lateralis*, Gr: *Gracilis*, VM: *Vastus Medialis*, Sa: *Sartorius*, BFSH: *Biceps Femoris*

9 *Short Head*, VI: *Vastus Intermedius*, ST: *Semitendinosus*, AL: *Adductor Longus*, BFLH:

10 *Biceps Femoris Long Head*, Pso: *Psoas*, SM: *Semimembranosus*, Ps: *Paraspinalis*, and

11 AM: *Adductor Major*.

12

13 **Figure 2: Yearly progression in thigh muscle fat replacement in symptomatic**

14 **LOPD patients.** The box plot includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentile, the mid lines indicate

15 the median, bars are the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup> percentiles. Each dot represents one symptomatic

16 LOPD patient. Mann-Whitney U Test, \*\*\*P<0.001

17

18 **Figure 3: Yearly progression of fat replacement in individual muscles of symptomatic**

19 patients. A: Each dot represents fat fraction calculated in a single muscle. Vertical lines

20 divide muscles based on baseline fat fractions: low (green dots, 0-30%), intermediate

21 (red dots, 30-60%) and severe (orange dots, 60-90%). B: Increase in muscle fat

22 replacement related to baseline fat fraction. The box plot includes the 25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup>

23 percentile, the mid lines indicate the median, bars correspond to the 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup> percentiles.

24 Black dots are outliers. Kruskal-Wallis test, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

25

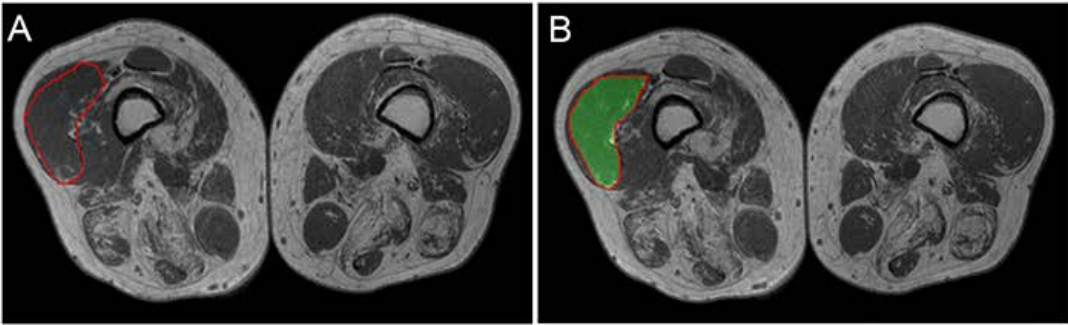
1 **Co-investigators – The Spanish Pompe Study Group:**

2 Miguel Angel Barba-Romero<sup>6</sup>, Joseba Barcena<sup>7</sup>, Pilar Carbonell<sup>8</sup>, María Rosario  
 3 Carzorla<sup>9</sup>, Carlota Creus<sup>10</sup>, Jaume Coll-Cantí<sup>11</sup>, Manuel Díaz<sup>12</sup>, Cristina Domínguez<sup>13</sup>,  
 4 Roberto Fernández Torrón<sup>14</sup>, María José García Antelo<sup>15</sup>, Josep Maria Grau<sup>16</sup>, Adolfo  
 5 López de Munáin<sup>14</sup>, Francisco Antonio Martínez-García<sup>17</sup>, Yolanda Morgado<sup>18</sup>, Antonio  
 6 Moreno<sup>19</sup>, Germán Morís<sup>20</sup>, Miguel Angel Muñoz-Blanco<sup>21</sup>, Andres Nascimento<sup>22</sup>, José  
 7 Luis Parajuá Pozo<sup>23</sup>, Arturo Robledo-Strauss<sup>24</sup>, Íñigo Rojas-Marcos<sup>25</sup>, Jose António  
 8 Salazar<sup>26</sup>, Mercedes Usón<sup>27</sup>

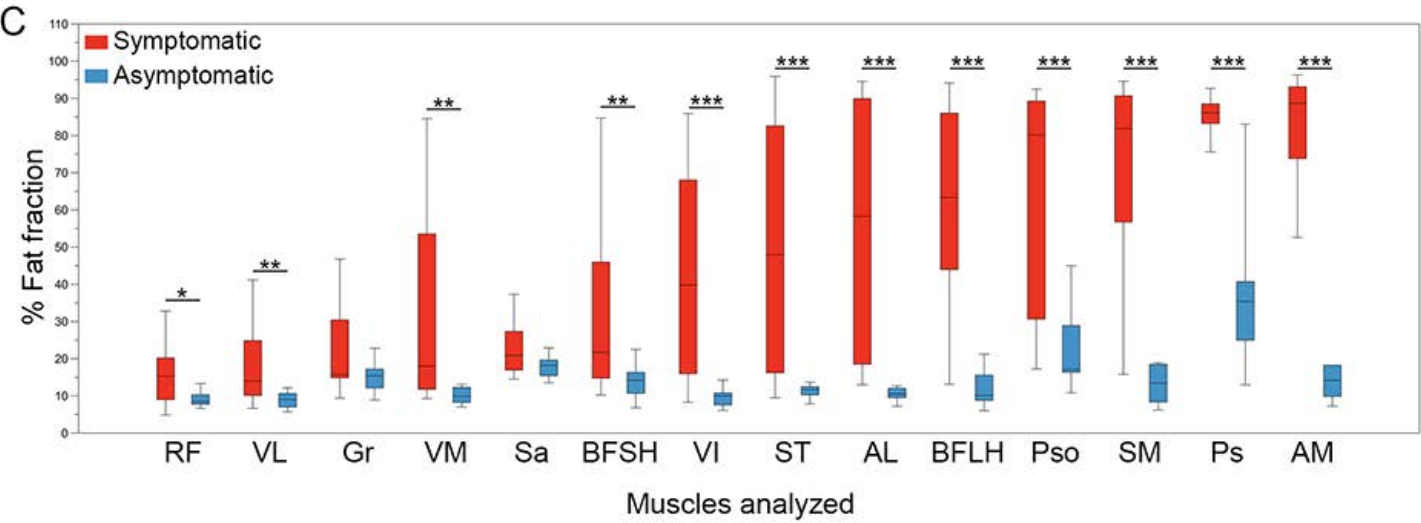
9

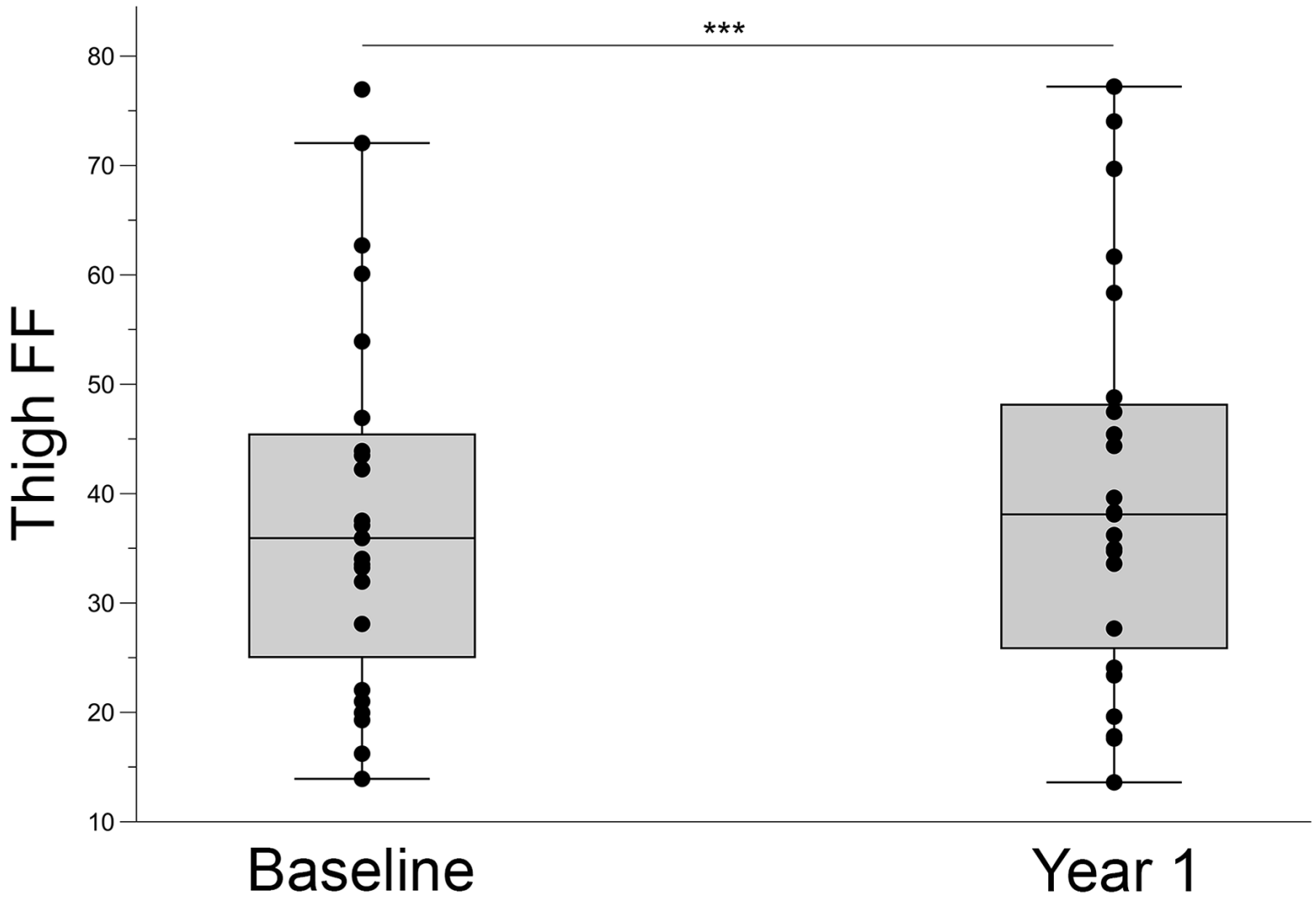
- 10 6. Internal Medicine Department. Hospital General de Albacete, Albacete, Spain
- 11 7. Neurology department, Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Spain.
- 12 8. Neurology department, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.
- 13 9. Pediatrics Department, Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain.
- 14 10. Neurology Department, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain.
- 15 11. Neurology Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain.
- 16 12. Neurology Department, Hospital de Cabueñes, Gijón, Spain.
- 17 13. Neurology Department, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain.
- 18 14. Neurology Department, Hospital Universitario Donostia, Spain.
- 19 15. Neurology Department, Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain.
- 20 16. Internal Medicine Department. Hospital Clínic, Barcelona, Spain
- 21 17. Neurology department, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca,  
 22 Murcia, Spain
- 23 18. Neurology Department. Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla, Spain
- 24 19. Neurology Department, Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia,  
 25 Spain.

- 1 20. Neurology Department, Hospital Universitario de Asturias, Oviedo, Spain.
- 2 21. Neurology Department, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain.
- 3 22. Pediatrics Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.
- 4 23. Internal Medicine Department, Hospital de Can Mises, Ibiza, Spain.
- 5 24. Neurology Department, Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain.
- 6 25. Neurology Department, Hospital Virgen de Macarena, Sevilla, Spain.
- 7 26. Neurology Department, Hospital Regional Universitario de Málaga, Spain.
- 8 27. Neurology Department, Hospital de Son Llàtzer, Palma de Mallorca, Balearic
- 9 Islands, Spain.
- 10

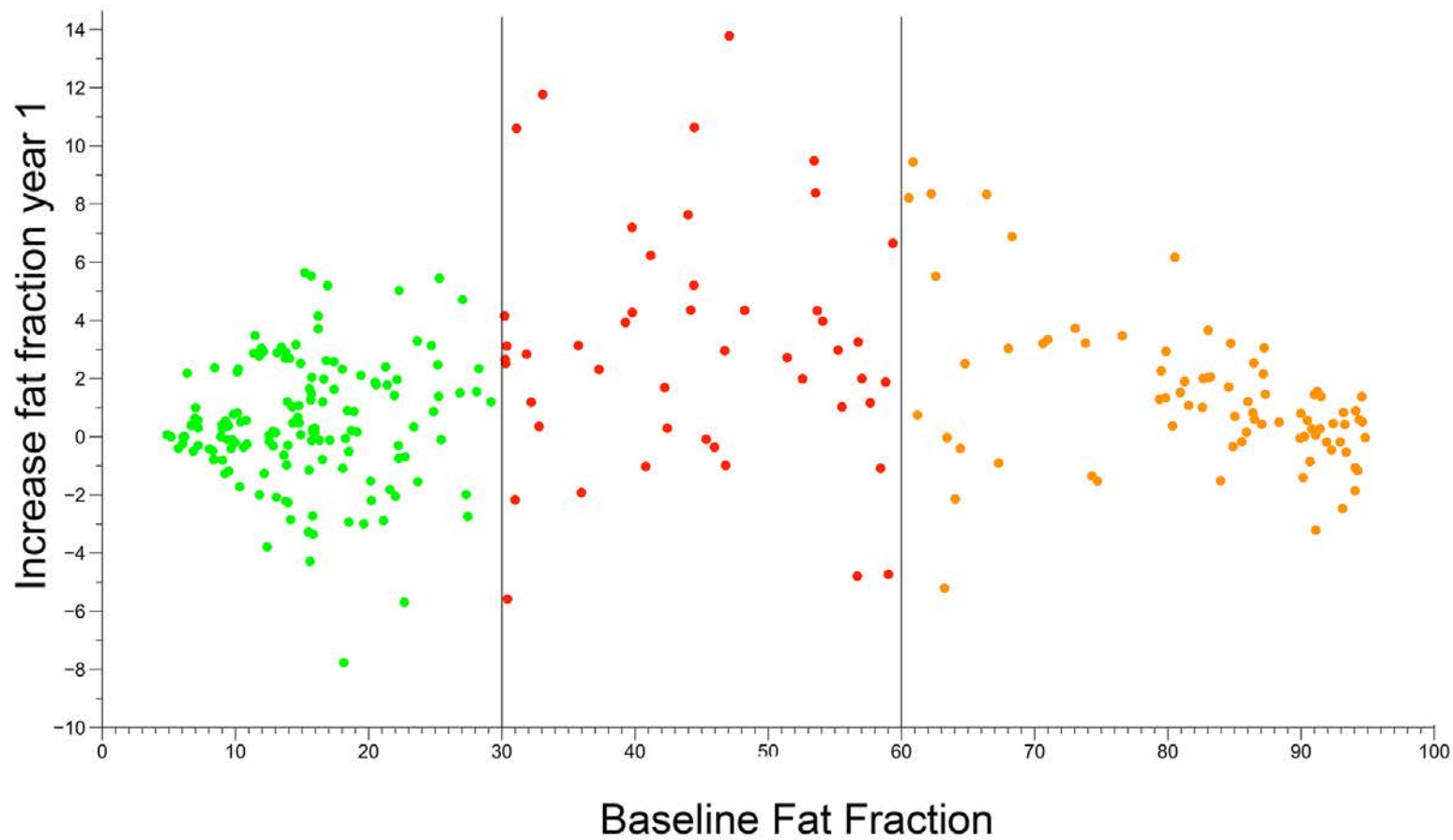


Muscle analyzed:  
 Vastus lateralis  
 Area: 17.8 cm  
 Fat fraction: 23.4%







**A****B**