



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIOS FISIOPATOLÓGICOS EN DISTROFIAS  
MUSCULARES: BIOMARCADORES PRONÓSTICOS Y  
APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS**

Autora: Esther Fernández Simón

Directores: Noemí de Luna Salvà y Jordi Díaz Manera

Tutora: M. Isabel Illa Sendra

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universidad Autònoma de Barcelona

2020



## AGRADECIMIENTOS

---

El resultado de esta tesis ha sido posible gracias al trabajo de muchas personas. Por este motivo me gustaría agradecer:

A la Dra. Isabel Illa, por permitirme entrar en el grupo de Neuromuscular y por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral.

A Eduard, por haber formado parte de la dirección de la tesis, por el apoyo brindado en este trabajo y por su disposición en todo momento a ayudar.

A los directores, Noemí y Jordi, gracias por todos los conocimientos transmitidos durante este tiempo. En particular, agradecer a Noemí todo el tiempo dedicado tanto en el trabajo del laboratorio como en la supervisión de tesis y artículos. Agradecer también su entusiasmo y positividad por el trabajo cuando los resultados no eran los mejores y su buen rollo como directora. A Jordi, gracias por el gran trabajo realizado para que todo salga adelante, por la confianza ofrecida, por haber defendido el bienestar como doctoranda y como no, por la oferta de futuro.

A los colaboradores que han permitido que muchos de los resultados de esta tesis hayan sido posibles. Agradecer al grupo de Neuromuscular de Sant Joan de Déu su colaboración en la búsqueda de biomarcadores y a la unidad de proteómica de IDIBELL por su trabajo en el proyecto de fibrosis muscular. También a todos los jóvenes voluntarios que nos ofrecieron un poco de su sangre.

A la fundación Isabel Gemio, por haber contribuido y financiado los proyectos presentados en esta tesis.

A todo el grupo de neuromuscular, por la ayuda durante estos 3 años y por haber compartido su conocimiento. Gracias a Janina, Alicia, Elena, Ricard, Ana Siles, Víctor, Sandra, Fina, Rodrigo, Jorge, David, Luis, Xavi, Patricia, Ana, Cinta, Sonia, Lorena y Elba. Muchos de ellos han pasado a ser amigos por todos los momentos tanto fuera como dentro del laboratorio, ya sea grabando un videoclip, de boda o en nuestra china.

En especial agradecer a Xavi y Patri por haber sido referentes en el trabajo y por haberme transmitido vuestra experiencia. Y como no a Cinta y Ana, por haber estado codo con codo en todo momento, ya sea para “cuidar” las células o para hacer queratinas. Ojalá poder trabajar siempre con vosotros.

Finalmente agradecer a mi familia y amigos por haberme permitido estudiar y por su apoyo en todo momento. De una forma u otra, vosotros también habéis formado parte de esta tesis.

## ABREVIATURAS

---

6MWT: prueba de la marcha de 6 minutos

AAV: virus adenoasociados

ACTA1: actina esquelética alfa 1

ACTIVLIM: escalas de actividades diarias

*ACTN3*: gen actinina 3

ADN: ácido desoxirribonucleico

AO: oligonucleótido antisentido

ArhGEF2: factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rho 2

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: trifosfato de adenosina

BMD: distrofia muscular de Becker

C3: C3 exoenzima

CCR7: receptor de quemoquina 7

CK: creatina quinasa

CKB: creatina quinasa tipo cerebral

CKM: creatina quinasa tipo muscular

C-L: actividad caspasa

CRIM negativo: pacientes con material inmunológico reactivo cruzado negativo

CRIM positivo: pacientes con material inmunológico reactivo cruzado positivo

CRISPR-Cas9: sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas asociado a la proteína enzimática 9

CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo

CT-L: actividad quimiotripsina

DAMP: patrones moleculares asociados a daño

DGC: complejo de distrofina-glicoproteína

DMD: distrofia muscular de Duchenne

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DYSF: gen disferlina

ECM: matriz extracelular

ERT: terapia de reemplazo enzimático

FABP3: proteína de transporte de ácidos grasos 3

F-actina: actina filamentosa

FAP: progenitor fibro-adipogénico

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

FLNC: filamina C

FOXO3: Forkhead box O3 protein

FVC: capacidad vital forzada

GAA: glucosidasa ácida alfa

Glc4: tetrasacáridos

GTP: guanisina trifosfato

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HDAC: histonas deacetilasas

IF: inmunofluorescencia

IFN- $\gamma$ : interferón gama

IGF-1: factor de crecimiento de insulina 1

IL: interleucina

INQoL: cuestionario individualizado de calidad de vida neuromuscular

IP: yoduro de propidio

iPSC: células madre pluripotentes

Kb: kilobases

WT: *wild type*

WB: western blot

PLC- $\gamma$ : fosfolipasa C gama

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

kDa: kiloDaltons

KO: knock-out

LCP1: plastina-2

LGMD: distrofia muscular de cinturas

LGMD-R2: Distrofia muscular de cintura recesiva tipo 2

LTBP4: proteína latente de unión al TGF $\beta$

M199: medio 199

M6F: manosa 6-fosfato

M6FR: receptor manosa 6-fosfato

MAPK: proteína quinasas activadas por mitógenos

MEP: presión respiratoria máxima

MFM-20: escala funcional motora 20

MIP: presión inspiratoria máxima

miARN: microARN

MLC: cadena ligera de la miosina

MMP: metaloproteasa

MRC: *Muscle Research Council*

MRF: factores miogénicos reguladores

Mrf4: factor regulador miogénico 4

MRI: resonancia magnética

MSTN: miostatina

Myf5: factor miogénico 5

MYL1: cadena de miosina ligera-1

MYL3: cadena de miosina ligera-3

MyoD1: proteína 1 de diferenciación miogénica

MYOM3: miomesina-3

NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NOS: óxido nítrico sintasa

NSAA: *North Star Ambulatory Assessment*

PAS: ácido periódico Schiff

Pax7: paired box 7

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFA: paraformaldehído

PMO: morfolino fosforodiamidato

PPARγ: receptor activado por proliferadores de peroxisomas gama

pre-ARNm: ARN mensajero precursor

PS: fosforotioato

qMRI: resonancia magnética cuantitativa

rhGAA: enzima recombinante humana GAA

RhoA-GTP: RhoA unido a GTP

ROC: *Receiver Operating Characteristic*

ROCK: proteína quinasa asociada a Rho

ROI: regiones de interés

ROS: especies reactivas de oxígeno

SC: células satélite

SDS: dodecilsulfato sódico

*SSP1*: gen osteopontina

sTnl: troponina esquelética I

TALEN: nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción

Tcf-4: factor de transcripción 4

TE-7: marcador de fibroblastos 7

TGFβ1: Factor de crecimiento transformante beta 1

TIMPs: inhibidores tisulares de metaloproteasas

T-L: actividad tripsina

TLR: toll-like receptor

TNFR: receptor factor de necrosis tumoral alfa

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

TNNT3: troponina T tipo 3

Tregs: células T reguladoras

TSP-1: trombospondina 1

TTN: titina

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

ZNF: dedos de zinc

$\alpha$ SMA: actinina alfa de músculo liso



# ÍNDICE

---

RESUMEN.....	15
ABSTRACT .....	16
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Miopatías hereditarias .....	19
1.1.1. Distrofias musculares .....	19
1.1.1.1. Distrofinopatías.....	21
1.1.1.1.1. Distrofia muscular de Duchenne (DMD) .....	22
1.1.1.1.2. Distrofia muscular de Becker (BMD).....	23
1.1.1.1.3. Distrofina .....	24
1.1.1.2. Distrofia muscular de cinturas.....	25
1.1.1.2.1. Distrofia muscular de cintura recesiva tipo 2 (LGMD-R2) .....	25
1.1.1.2.2. Disferlina .....	26
1.1.2. Miopatías metabólicas.....	27
1.1.2.1. Enfermedad de Pompe.....	28
1.1.2.2. GAA.....	29
1.2. Fisiopatología del músculo esquelético.....	30
1.2.1. Regeneración .....	31
1.2.2. Inflamación .....	35
1.2.3. Fibrosis.....	39
1.2.3.1. Factores implicados en la activación de fibroblastos.....	42
1.2.3.2. PDGF .....	43
1.2.3.2.1. Respuesta señalización PDGF .....	44

1.2.3.2.2. Respuesta celular PDGF .....	44
1.3. Tratamientos.....	45
1.3.1. Terapias celulares .....	45
1.3.2. Estrategias genéticas .....	46
1.3.2.1 Corrección gen mutado .....	47
1.3.2.2. Salto de exón .....	47
1.3.2.3. Supresión codón terminación .....	49
1.3.3. Sobreexpresión/reemplazo de la proteína mutada.....	49
1.3.4. Aproximaciones farmacológicas .....	51
1.3.4.1. Estrategias para inhibir la fibrosis .....	51
1.4. Biomarcadores .....	54
1.4.1. Composición del tejido.....	54
1.4.2. MicroARNs (miARNs) .....	55
1.4.3. Proteínas y metabolitos .....	55
2. HIPÓTESIS .....	59
3. OBJETIVOS .....	63
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	67
4.1. Pacientes.....	69
4.1.1. Pruebas de función muscular .....	69
4.1.2. Imagen muscular .....	70
4.2. Estudios <i>in vitro</i> .....	71
4.2.1. Cultivos primarios humanos y de líneas celulares .....	71
4.2.2. Tratamiento con inhibidores proteasoma y EB1089.....	72

4.2.2.1.	Ensayo reparación.....	72
4.2.3.	Tratamiento PDGF-AA e inhibidores vía RhoA .....	73
4.2.3.1.	Ensayo proliferación celular.....	73
4.2.3.2.	Ensayo migración celular.....	74
4.2.3.3.	Cuantificación de colágeno <i>in vitro</i> .....	74
4.3.	Biología molecular .....	75
4.3.1.	Ensayo de la luciferasa con inhibidores del proteasoma.....	75
4.3.2.	Activación RhoA-GTP mediante PDGF-AA.....	76
4.3.3.	Contenido actina filamentosa.....	77
4.4.	Western-Blot (WB).....	77
4.5.	Análisis proteómico.....	78
4.5.1.	Extracción y digestión proteica .....	78
4.5.2.	Cromatografía líquida – espectrometría de masas.....	78
4.5.3.	Procesamiento de datos .....	79
4.5.4.	Análisis bioinformático.....	79
4.6.	ELISA .....	79
4.7.	Inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IH) .....	80
4.8.	Estadística .....	81
5.	RESULTADOS .....	83
5.1.	Aproximaciones terapéuticas en un modelo celular de disferlinopatía .....	85
5.1.1.	Tratamiento de Vitamina D3 y EB1089.....	85
5.1.2.	Inhibición del proteasoma.....	86
5.1.3.	Expresión de disferlina y miogenina .....	88

5.1.4.	Expresión de TSP-1 .....	89
5.1.5.	Ensayo reparación.....	90
5.2.	Vías moleculares y aproximaciones terapéuticas implicadas con la fibrosis y PDGF-AA .....	91
5.2.1.	Expresión de PDGF-AA en músculo DMD y control .....	91
5.2.2.	Proteómica fibroblastos tratados con PDGF-AA .....	92
5.2.3.	Análisis vía RhoA .....	94
5.2.4.	Efectos del PDGF-AA, C3 y fasudil en la expresión de actina filamentosa y colágeno. Efectos en la proliferación y migración .....	97
5.3.	Búsqueda de nuevos biomarcadores en distrofias musculares y enfermedad de Pompe.....	99
5.3.1.	Biomarcadores en enfermedad de Pompe.....	99
5.3.1.1.	PDGF-BB diferencia entre pacientes Pompe sintomáticos y asintomáticos .....	101
5.3.1.2.	Correlación entre PDGF-BB y resultados de pruebas funcionales y qMRI.....	103
5.3.2.	Biomarcadores en distrofias musculares .....	104
5.3.2.1.	Correlación biomarcadores y resultados de las pruebas funcionales.....	106
5.3.2.2.	Correlación entre biomarcadores y resultados de qMRI .....	109
6.	DISCUSIÓN.....	111
7.	CONCLUSIONES.....	123
8.	LÍNEAS DE FUTURO .....	127
9.	BIBLIOGRAFIA.....	131

10. ANEXO .....	159
-----------------	-----



## RESUMEN

---

Las distrofias musculares son enfermedades hereditarias caracterizadas por una degeneración progresiva de las fibras musculares que lleva a la destrucción del tejido muscular esquelético, lo que conduce a una debilidad muscular que progresa en el tiempo y se asocia a un grado de discapacidad variable. Por otro lado, las miopatías metabólicas, como la glucogenosis tipo II o enfermedad de Pompe, también son enfermedades hereditarias pero se caracterizan por tener alteraciones en el metabolismo de la fibra muscular. La enfermedad de Pompe plantea algunas similitudes clínicas con las distrofias musculares. A pesar de las similitudes clínicas, la fisiopatología de las distrofias y de la enfermedad de Pompe es muy diferente. En el caso de las distrofias musculares no existe un tratamiento efectivo, mientras que en la enfermedad de Pompe la terapia de sustitución enzimática ha cambiado la historia natural de la enfermedad, especialmente en las formas infantiles. Por tanto, es de interés la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas en distrofias musculares. Aunque la terapia génica se postula como el tratamiento más efectivo y definitivo, los tratamientos encaminados a frenar el proceso degenerativo del músculo podrían ayudar a la efectividad de la terapia génica. Por este motivo, testar terapias que hayan mostrado resultados positivos en otras distrofias y conocer mejor los mecanismos moleculares involucrados en la fisiopatología del músculo distrófico son temas que necesitan ser estudiados. Por otra parte, es importante la búsqueda de biomarcadores que permitan conocer el estado del paciente tanto en distrofias musculares como en la enfermedad de Pompe para poder conocer de forma sencilla y no invasiva su respuesta a estas nuevas terapias.

## ABSTRACT

---

Muscular dystrophies are inherited diseases characterized by a progressive loss of muscle fibers and its replacement by fibrotic and fatty tissue leading to muscle weakness and disability that progresses over time. Metabolic myopathies are hereditary diseases produced by mutations encoding enzymes participating in the catabolic pathways required to obtain energy. Type II glycogenosis, also known as Pompe disease, shares some clinical similarities with muscular dystrophies, specially the development of progressive weakness in proximal muscles of the limbs. Despite of the clinical similarities, the pathophysiology of muscular dystrophies and Pompe disease is different. In the case of muscular dystrophies, there is not an effective pharmacological treatment, whereas in Pompe disease, enzyme replacement therapy has improved the natural history of the disease. However, the search for new therapeutic approaches in both diseases is a scientific field of interest. Although gene therapy is postulated as the most effective and potentially a definitive cure, new treatments aimed to slow down the degenerative process of muscle could be helpful to maintain the results obtained with gene therapy over time. For this reason, only a complete understanding of the molecular mechanisms involved in the pathophysiology of these diseases will allow us to propose new treatments or even repurpose already existing ones in cellular and animal models of these diseases. On the other hand, the identification of non-invasive biomarkers for the follow up of patients in muscular dystrophies and Pompe disease is an unmet need especially relevant at the present moment, when clinical trials with new generation treatments are under design.

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. Miopatías hereditarias

---

Las miopatías hereditarias son un grupo de enfermedades de origen genético con una serie de características clínicas e histológicas. La presencia de alteraciones en las biopsias musculares nos ayuda a clasificar las diferentes enfermedades musculares. La causa de estas enfermedades son mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en la estructura o metabolismo del músculo esquelético. El diagnóstico se basa en características clínicas, resultados de la biopsia muscular, imagen musculares, pero principalmente en análisis genéticos (1). Aunque su clasificación está constantemente bajo revisión debido a la identificación de nuevos genes, por el momento sigue basándose en las características de la biopsia muscular (2).

### 1.1.1. Distrofias musculares

Las distrofias musculares son enfermedades hereditarias caracterizadas por una degeneración progresiva de las fibras musculares que lleva a la destrucción del tejido muscular esquelético (3). Esta degeneración lleva al paciente a desarrollar una debilidad muscular que progresa en el tiempo y produce un grado de discapacidad variable, desde la necesidad de ayudas para la marcha hasta la dependencia total de terceras personas para realizar cualquier actividad de la vida diaria. En el caso de las distrofias musculares de cinturas la debilidad se inicia de forma típica en la musculatura proximal de las extremidades inferiores y superiores para ir progresando con el tiempo afectando a musculatura distal y axial. El ritmo de evolución es muy variable, desde rápido como en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) a lento como en la distrofia muscular por déficit de lámina (4). En muchas de estas enfermedades, el músculo cardíaco se afecta y puede evolucionar de forma paralela a la debilidad muscular, de modo que en algunos casos existe una afectación cardíaca grave sólo en fases avanzadas de las enfermedades, mientras que en otras enfermedades, la afectación cardíaca es temprana. La musculatura respiratoria también puede

afectarse. En esos casos el paciente puede desarrollar síntomas como disnea de esfuerzo, ortopnea o síntomas relacionados con hipoventilación nocturna. Es importante tener en cuenta que las causas cardíacas y respiratorias son el principal motivo de muerte en las distrofias musculares (5).

El origen de las distrofias musculares son mutaciones en genes responsables de la codificación de proteínas estructurales de la célula muscular. La ausencia de estas proteínas provoca la inestabilidad de la membrana celular una vez se somete al estrés mecánico producido durante la contracción muscular. Como resultado a la inestabilidad celular se produce la ruptura de la célula (6). Genéticamente, las distrofias musculares pueden clasificarse según la herencia: autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X (7), aunque actualmente, las distrofias musculares se agrupan según la similitud fenotípica de la enfermedad. Mientras que la DMD y la distrofia muscular de Becker (BMD) son enfermedades ligadas al cromosoma X, las distrofias musculares de cinturas (LGMD) están formadas por un grupo de enfermedades heterogéneas que se clasifican según si son dominantes (D) o recesivas (R). El número que sigue a la letra de la herencia (D o R) pertenece al orden de descubrimiento de la proteína afectada (Tabla 1) (8).

La biopsia muscular muestra las características histológicas que definen las distrofias musculares: presencia de variabilidad en el tamaño de las fibras, núcleos centrales, fenómenos de degeneración-regeneración, necrosis o división de fibras, presencia de infiltrados inflamatorios, aumento del tejido conectivo del perimisio y endomisio y aumento del tejido graso (9).

Old name	Gene	Proposed new nomenclature	Reason for exclusion
LGMD 1A	<i>Myot</i>	Myofibrillar myopathy	Distal weakness
LGMD 1B	<i>LMNA</i>	Emery–Dreifuss muscular dystrophy (EDMD)	High risk of cardiac arrhythmias; EDMD phenotype
LGMD 1C	<i>CAV3</i>	Rippling muscle disease	Main clinical features rippling muscle disease and myalgia
LGMD 1D	<i>DNAJB6</i>	LGMD D1 DNAJB6-related	
LGMD 1E	<i>DES</i>	Myofibrillar myopathy	Primarily false linkage; distal weakness and cardiomyopathy
LGMD 1F	<i>TNP03</i>	LGMD D2 TNP03-related	
LGMD 1G	<i>HNRNPDL</i>	LGMD D3 HNRNPDL-related	
LGMD 1H	?	Not confirmed	False linkage
LGMD 1I	<i>CAPN</i>	LGMD D4 calpain3-related	
LGMD 2A	<i>CAPN</i>	LGMD R1 calpain3-related	
LGMD 2B	<i>DYSF</i>	LGMD R2 dysferlin-related	
LGMD 2C	<i>SGCG</i>	LGMD R5 $\gamma$ -sarcoglycan-related <sup>3</sup>	
LGMD 2D	<i>SGCA</i>	LGMD R3 $\alpha$ -sarcoglycan-related	
LGMD 2E	<i>SGCB</i>	LGMD R4 $\beta$ -sarcoglycan-related	
LGMD 2F	<i>SGCD</i>	LGMD R6 $\delta$ -sarcoglycan-related	
LGMD 2G	<i>TCAP</i>	LGMD R7 telethonin-related	
LGMD 2H	<i>TRIM32</i>	LGMD R8 TRIM 32-related	
LGMD 2I	<i>FKRP</i>	LGMD R9 FKRP-related	
LGMD 2J	<i>TTN</i>	LGMD R10 titin-related	
LGMD 2K	<i>POMT1</i>	LGMD R11 POMT1-related	
LGMD 2L	<i>ANO5</i>	LGMD R12 anoctamin5-related	
LGMD 2M	<i>FKTN</i>	LGMD R13 Fukutin-related	
LGMD 2N	<i>POMT2</i>	LGMD R14 POMT2-related	
LGMD 2O	<i>POMGnT1</i>	LGMD R15 POMGnT1-related	
LGMD 2P	<i>DAG1</i>	LGMD R16 $\alpha$ -dystroglycan-related	
LGMD 2Q	<i>PLEC</i>	LGMD R17 plectin-related	
LGMD 2R	<i>DES</i>	myofibrillar myopathy	Distal weakness
LGMD 2S	<i>TRAPPC11</i>	LGMD R18 TRAPPC11-related	
LGMD 2T	<i>GMPPB</i>	LGMD R19 GMPPB-related	
LGMD 2U	<i>ISPD</i>	LGMD R20 ISPD-related	
LGMD 2V	<i>GAA</i>	Pompe disease	Known disease entity, histological changes
LGMD 2W	<i>PINCH2</i>	PINCH-2 related myopathy	Reported in one family
LGMD 2X	<i>BVES</i>	BVES related myopathy	Reported in one family
LGMD 2Y	<i>TORIAIP1</i>	TORIAIP1 related myopathy	Reported in one family
LGMD 2Z	<i>POGLUT1</i>	LGMD R21 POGLUT1-related	
Bethlem myopathy recessive	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3</i>	LGMD R22 collagen 6-related	
Bethlem myopathy dominant	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3</i>	LGMD D5 collagen 6-related	
Laminin $\alpha$ 2-related muscular dystrophy	<i>LAMA2</i>	LGMD R23 laminin $\alpha$ 2-related	
POMGNT2-related muscular dystrophy	<i>POMGNT2</i>	LGMD R24 POMGNT2-related	

**Tabla 1.** Comparación de la clasificación antigua de LGMD con la actual (8).

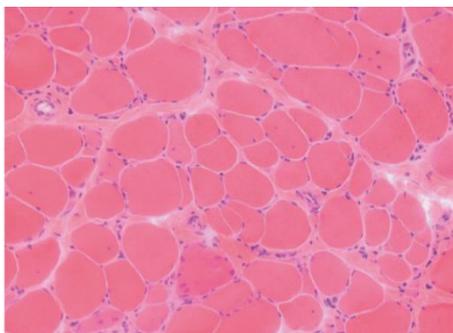
### 1.1.1.1. Distrofinopatías

La DMD y BMD se clasifican como distrofinopatías, ya que su causa es una pérdida total (DMD) o parcial (BMD) de la proteína distrofina. La diferencia clínica entre la DMD y la BMD se debe a la diferencia de expresión de la distrofina. La BMD se presenta cuando el marco de lectura del gen se conserva, mientras que cuando no se conserva tenemos una DMD (10). El gen codificante para la distrofina se encuentra en la posición 21 del brazo corto del cromosoma X (Xp21). Las deleciones en uno o múltiples exones son las mutaciones más comunes, siendo el 60-70% de los casos en la DMD y el 80-85% de los casos de BMD. Las mutaciones puntuales representan un 26% de casos en la DMD y un 13% en la BMD, mientras que las duplicaciones de exones representan un 10-15% de los casos para la DMD y un 5-10% de los casos

para la BMD (11). Un 33% de los casos se producen por nuevas mutaciones (conocidas comúnmente como mutaciones de *novo*) en el gen de la distrofina (12). Como el gen de la distrofina se encuentra en el cromosoma X, las distrofinopatías afectan a varones. Sin embargo, entre un 5 y un 10% de las mujeres portadoras presentan algún grado de debilidad muscular que se puede manifestar ya en la infancia o no ser evidente hasta la vida adulta.

La histología del músculo en los pacientes con distrofinopatías presenta variaciones en el tamaño de la fibra, núcleos internos en las fibras, fibras regenerativas, necrosis, invasión de macrófagos, células T y mastocitos en zonas necróticas, predominio de fibras tipo 1, y finalmente sustitución de tejido muscular por tejido graso y conectivo (Figura 1). La gravedad clínica no puede ser juzgada en base a la histología exclusivamente, ya que no es posible distinguir una biopsia de DMD o BMD (9).

El déficit de distrofina en el músculo provoca la rotura de la membrana muscular, lo que lleva a la pérdida de enzimas musculares, incluyendo la creatina quinasa (CK), la cual se encuentra entre 50 y 100 veces más elevada de lo normal (13).



**Figura 1. Tinción de hematoxilina y eosina de un niño de 9 años con DMD.** Se observan variación del tamaño de fibras separadas por un excesivo tejido conectivo, aumento de núcleos internos, fibras necróticas y fibras partidas (9).

#### 1.1.1.1.1. Distrofia muscular de Duchenne (DMD)

El desarrollo de los primeros síntomas en la DMD suele ser muy temprano, entre los 3 y 5 años de edad. Los niños muestran dificultades motoras, incluidas retraso en el movimiento y más tarde, en actividades como subir escaleras. Una de las características principales en niños es la necesidad de realizar la maniobra de Gowers para levantarse, la cual es compatible con una debilidad proximal de cintura pelviana

(14). Esta maniobra se basa en levantarse usando los brazos para complementar la debilidad de la cintura pélvica (15). La debilidad muscular es progresiva y comienza afectando a la cintura pélvica, posteriormente a la musculatura axial y finalmente a la distal de los miembros (16). A medida que avanza la enfermedad, los niños necesitan ayuda para el movimiento, y hacia los 12 años aproximadamente acaban utilizando una silla de ruedas. La afectación pulmonar y cardíaca se desarrolla a medida que la enfermedad avanza. Gracias a la mejoría en el soporte ventilatorio y cardíaco los pacientes pueden llegar a vivir hasta los 30 años (17). Además, hasta un 20% de los pacientes presentan un coeficiente intelectual menor de 70 (18).

Las mutaciones en la DMD están asociadas a un cambio de la pauta de lectura causando codones de terminación prematuros. El resultado son transcritos mutados que son susceptibles a la degradación y como consecuencia se produce ausencia de proteína en las células (19).

#### 1.1.1.1.2. Distrofia muscular de Becker (BMD)

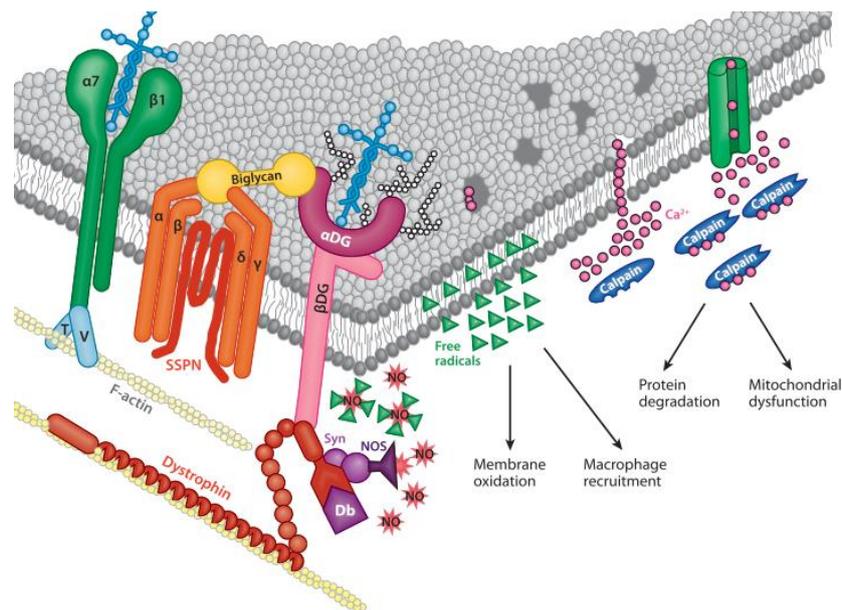
En la BMD, la distribución de la afectación muscular es similar a la de la DMD, pero el curso de la enfermedad es más benigno, siendo la edad de inicio de los síntomas hacia los 12 años. La pérdida de ambulación varía desde la adolescencia en adelante. La supervivencia de los pacientes con BMD suele ser hasta la 5ª década (20,21). A pesar de la afectación más leve en el músculo esquelético, la insuficiencia cardíaca es la causa más común de muerte. No es infrecuente que los pacientes desarrollen en mayor o menor medida debilidad de la musculatura ventilatoria. Una proporción de los casos también presentan algún grado de discapacidad intelectual (22).

El gen responsable de la enfermedad también es la distrofina, pero a diferencia de la DMD, en la BMD las mutaciones causantes son deleciones que mantienen el marco de lectura, por tanto aunque se produce una proteína anormal, ésta no se degrada (13). Además, también se han descrito mutaciones sin sentido (*nonsense*) que inducen un

salto del exón (*exon skipping*) compatible con un marco de lectura respetado. El resultado es una proteína truncada parcialmente funcional (20),(23).

### 1.1.1.1.3. Distrofina

La distrofina es una proteína del citoesqueleto de 427 kiloDaltons (kDa) que se encuentra en la membrana de las células musculares, conecta el citoesqueleto intracelular con la matriz extracelular y forma parte del complejo multimérico distrofina glicoproteína (DGC) (11). Este complejo está compuesto por proteínas de membrana que incluyen sarcoglicanos, sarcospanos, distroglicanos, distrobrevinas y sintrofinas. El dominio N-terminal de la distrofina se une a la actina filamentosa del citoesqueleto. La parte transmembrana de la distrofina se une al  $\beta$ -distroglicano que a la vez se une al  $\alpha$ -distroglicano para formar el subcomplejo distroglicano (Figura 2).



**Figura 2. Complejo DGC. Interacción de la distrofina con otras proteínas de membrana.** El DGC consiste en el conjunto de sarcoglicanos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , biglicano y sarcospano (SSPN); Este subcomplejo se asocia con la matriz extracelular gracias a su interacción con el complejo distroglicano. La subunidad  $\beta$ -distroglicano se asocia directamente con la distrofina, y la distrofina se une directamente a la actina filamentosa. El dominio C-terminal se asocia con la distrobrevina (Db) y sintrofina (Syn) (23).

Para completar el eje de unión del citoesqueleto a la matriz extracelular (ECM), la proteína  $\alpha$ -distroglicano se une a la laminina en la lámina basal. Las distrobrevinas y sintrofinas son proteínas citoplasmáticas que están unidas a la distrofina por el

dominio C-terminal. Tanto la distrobrevina como sintrofina interactúan entre ellas y además, la sintrofina también se une al óxido nítrico sintasa (NOS) (23). Su función es la de estabilizar la membrana durante la contracción muscular para prevenir el daño inducido por las contracciones. Además también regula la adhesión celular y transducción de la fuerza mecánica. Mutaciones en el gen de la distrofina provocan la desestabilización del complejo DGC produciendo un daño en el sarcolema cada vez que se realiza una contracción muscular (25).

#### **1.1.1.2. Distrofia muscular de cinturas**

Las distrofias musculares de cinturas están causadas por múltiples genes que codifican proteínas del sarcolema, citosol o núcleo de los miocitos. Las formas autosómicas dominantes son muy raras (representan un 5-10% de todas las LGMD) y generalmente menos severas que las autosómicas recesivas (26).

La edad de inicio de las distrofias de cinturas suele ser entre la segunda y tercera década pero a veces también durante la mediana edad. Existen más de 30 subtipos de LGMD identificadas, caracterizados por una debilidad muscular proximal simétrica, problemas respiratorios, cardiomiopatías y en ocasiones arritmias cardíacas. Todos los subtipos presentan heterogeneidad tanto clínica como genética (27).

En la mayoría de los subtipos de LGMD, la causa de la enfermedad es la inestabilidad de la membrana muscular lo que conlleva la degeneración de la fibra muscular, de forma similar a lo que ocurre en las distrofinopatías (28).

##### **1.1.1.2.1. Distrofia muscular de cintura recesiva tipo 2 (LGMD-R2)**

Las disferlinopatías son un grupo de enfermedades musculares producidas por mutaciones en el gen de la disferlina (*DYSF*) de herencia autosómica recesiva. El gen *DYSF* se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma 2. Del total de variantes patogénicas descritas, un 66% de los casos corresponde a mutaciones puntuales, un 20% a deleciones, un 10% a duplicaciones, un 2% a inserciones y otro 2% a la

combinación de inserción/duplicación (29). La edad de inicio de los síntomas suele ser entre la segunda y tercera década de vida, aunque hay algunos casos descritos con inicio infantil y tardío (30,31). Existen diferentes fenotipos dentro de las disferlinopatías, pero los más comunes son la distrofia muscular de cinturas R2 (LGMD-R2) y la enfermedad de Miyoshi. Ambas se caracterizan por presentar niveles altos de CKs en sangre, entre 10 y 150 veces más de lo normal (32).

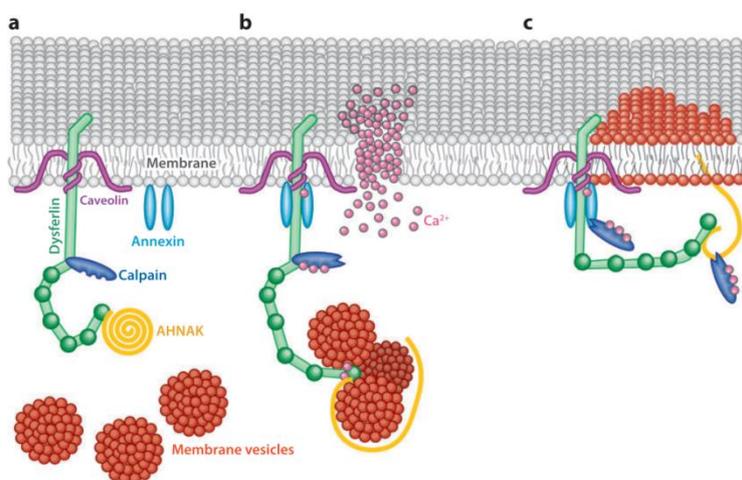
En la LGMD-R2, la musculatura que se afecta inicialmente es la proximal, aunque posteriormente se afecta la musculatura de la cintura escapular y la distal posterior de las piernas y cuando la enfermedad ya está avanzada se presenta una debilidad muscular generalizada con un componente axial. No hay habitualmente afectación cardíaca ni respiratoria (27). La histología muscular de la LGMD-R2 presenta las características comunes de las distrofias musculares (variabilidad del tamaño de la fibra, necrosis y regeneración, núcleos internos y aumento del tejido conectivo). Además, la presencia de infiltrados inflamatorios es una característica común en las biopsias de LGMD-R2 (9).

#### 1.1.1.2.2. Disferlina

La disferlina está compuesta por 55 exones que codifican una proteína de 230 kDa. Ésta se expresa en varios tejidos como en el riñón, músculo cardíaco, músculo esquelético e incluso monocitos de sangre periférica (33).

La disferlina es una proteína de membrana que pertenece a la familia de las ferlinas, un grupo de proteínas compuestas por varios dominios C2 sensibles al calcio que están implicados en la fusión de vesículas y en la reparación de la membrana. En el caso de la disferlina, ésta tiene un dominio transmembrana y 7 dominios C2 con distinta afinidad por el calcio y los fosfolípidos de membrana y además regula la unión a otros complejos proteicos (34,35). La disferlina interacciona con otras proteínas intracelulares, favoreciendo procesos de señalización y transporte de vesículas. Entre las diferentes proteínas con las que interacciona destaca su interacción con caveolina-

3. Se cree que esta interacción participa en la fusión de mioblastos para formar miotubos. Además, interacciona también con la calpaína-3 (proteasa activada por calcio), tubulina o la nucleoproteína AHNAK. Otras interacciones son temporales y dependientes de calcio, como es la unión de la disferlina con la anexina A1 y A2 y calpaína-3 (Figura 3) (36). La interacción con estas proteínas es importante para la reparación del sarcolema. La interrupción de la membrana causa la entrada de calcio en la fibra muscular activando proteasas como la calpaína además de vesículas de reparación que se acumulan en la zona dañada del sarcolema (37).



**Figura 3. Interacción de la disferlina durante la reparación de membrana.** a) La disferlina se localiza en el sarcolema e interacciona con la caveolina-3, AHNAK y calpaína-3. b) El daño en la membrana resulta en la entrada de calcio provocando que las anexinas se unen a disferlina y la calpaína-3 se activa. Estas interacciones promueven el reclutamiento de estructuras vesiculares internas. c) Tras la activación, las lesiones de membrana se reparan, la concentración de calcio se normaliza y el complejo de reparación se desactiva mediante calpaínas, que deshacen la unión de anexinas y AHNAK (23).

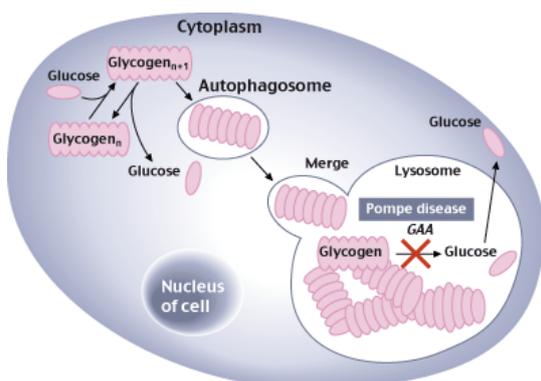
La disferlina se localiza en diferentes zonas de las fibras musculares: en el sarcolema, donde tiene una función relacionada con la reparación del daño de la membrana y en los túbulos transversos T, donde tiene un papel en el mantenimiento de la homeostasis del calcio producido por el estrés celular (38). La disferlina está implicada también en la señalización intracelular y en el proceso de diferenciación de mioblasto a miotubo (39).

### 1.1.2. Miopatías metabólicas

Las miopatías metabólicas son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que se pueden presentar a cualquier edad. En este grupo se incluyen todas aquellas miopatías en las que se produce una alteración del metabolismo de la fibra muscular (40). Existen 4 grupos principales de miopatías metabólicas: glucogenosis musculares, miopatías lipídicas, trastorno del metabolismo de las purinas y miopatías mitocondriales (41). Las miopatías metabólicas se caracterizan por ser multisistémicas con un amplio rango de signos y síntomas. La debilidad muscular suele ser proximal y axial (con patrón similar a las distrofias musculares de cinturas) asociado a fallo respiratorio en el caso de la glucogenosis tipo II (42). En esta tesis hemos estudiado algunos aspectos de la glucogenosis tipo II por ser una enfermedad que plantea algunas similitudes clínicas y de diagnóstico diferencial con las distrofias de cinturas.

#### 1.1.2.1. Enfermedad de Pompe

La glucogenosis de tipo II, también conocida como enfermedad de Pompe o deficiencia de maltasa ácida, está causada por mutaciones en el gen que codifica para el enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA). Éste participa en la degradación de glucógeno a glucosa en los lisosomas de las células. Mutaciones en el gen *GAA* causan una actividad deficiente en el enzima, provocando un acúmulo de glucógeno en los lisosomas de diferentes tejidos (Figura 4), pero especialmente en el tejido cardíaco, en el músculo liso y en el músculo esquelético (43). Existen evidencias que el glucógeno también se acumula en el sistema nervioso central de pacientes con enfermedad de Pompe (44).



**Figura 4. Fisiología del glucógeno en la enfermedad de Pompe.** La deficiencia de GAA impide la degradación de glucógeno a glucosa, promoviendo la acumulación de glucógeno en el lisosoma.

La enfermedad de Pompe es de herencia autosómica recesiva y se han descrito más de 400 mutaciones en el gen *GAA*. El tipo de mutación va a establecer la actividad residual enzimática que en última instancia va a determinar la gravedad del fenotipo de los pacientes (45).

La enfermedad de Pompe se puede clasificar como forma infantil o adulto, dependiendo de la edad de inicio de los síntomas. La forma infantil clásica es muy severa debido a que la actividad de la enzima es aproximadamente del 1% (46). La progresión de la enfermedad es muy rápida y los pacientes si no se tratan mueren antes del primer año de vida por insuficiencia cardiorrespiratoria (47). En cambio, la forma adulta presenta una clínica mucho más heterogénea que va desde pacientes asintomáticos, en los que solamente se identifica una hiperCKemia en la analítica, a pacientes con debilidad muscular progresiva que afecta a la cintura, a la musculatura axial y a la respiratoria, implicando especialmente al diafragma. Cuando la enfermedad se inicia en edad adulta, la progresión de ésta es mucho más lenta que en las formas infantiles (48).

La biopsia muscular muestra variación en el tamaño de las fibras o la presencia de núcleos internos. No obstante, la característica principal de la enfermedad es el depósito de glucógeno en el interior de vacuolas en el sarcoplasma, que son positivas para la tinción de ácido periódico Schiff (PAS). Al existir un acúmulo de lisosomas, debido a la incapacidad de degradar el glucógeno de su interior, la tinción de fosfatasa ácida es positiva, lo que es característico de esta enfermedad (9).

#### **1.1.2.2. GAA**

El gen *GAA* se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q25), tiene 28 kb y está compuesto por 20 exones. Las mutaciones con cambio de sentido (*missense*) representan un 51% de los casos, las pequeñas deleciones un 15% y las variantes de

*splicing* un 13%. El resto de mutaciones son sin sentido (*nonsense*) e inserciones/duplicaciones. Las mutaciones más graves son aquellas donde se produce un codón de terminación prematuro, ya que los transcritos resultantes son degradados con la consecuente pérdida de la GAA (49,50). En general, las mutaciones que producen una ausencia de todas las formas de la GAA son aquellas que provocan un fenotipo severo y de progresión rápida. En cambio, las mutaciones que dejan una actividad residual de GAA provocan un fenotipo más leve (51,52).

La enzima se sintetiza como un precursor de 110 kDa que se modifica post-traduccionalmente en el retículo endoplasmático. La glicosilación es importante para el transporte hasta el aparato de Golgi, donde se le añade una señal lisosomal, la manosa 6-fosfato (M6F), imprescindible para la unión al receptor manosa 6-fosfato (M6PR) (53). El enzima unido al M6PR se encuentra en una vesícula que va del aparato de Golgi a los endosomas, donde se separa del receptor para ser liberado en los lisosomas (54).

El glucógeno lisosomal se acumula cuando la actividad GAA es baja. El umbral de la actividad de la enzima depende de cada órgano en el que se expresa (55). La pérdida de la estructura muscular se debe al aumento de lisosomas llenos de glucógeno en el espacio intermiofibrilar, lo que lleva a la ruptura del lisosoma y a la acumulación de éste en el citoplasma, interfiriendo en la arquitectura de la fibra muscular (54).

## **1.2. Fisiopatología del músculo esquelético**

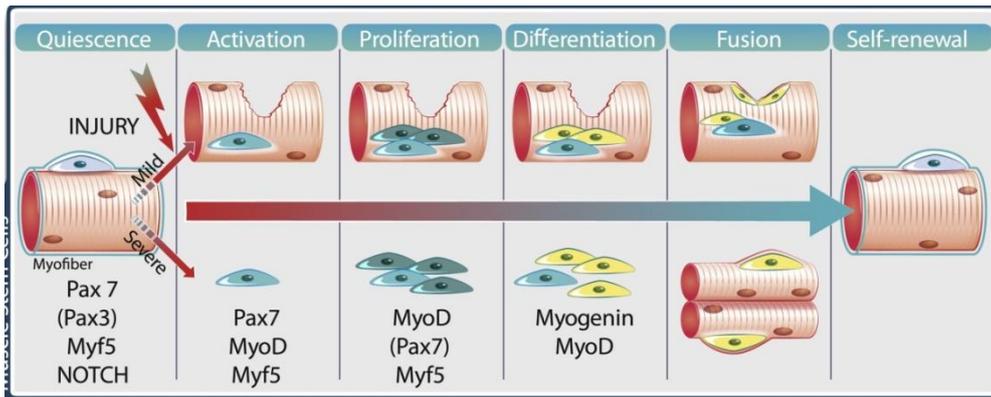
---

Las células satélite (SC), células madre del músculo esquelético, residen en un ambiente cuyas características cambian dinámicamente durante la regeneración, inflamación y fibrosis del tejido. La plasticidad de este ambiente se atribuye a la regulación por las SC pero también a la de otros tipos celulares, en particular a las células inmunológicas, fibrogénicas y a las SC ya diferenciadas. En los siguientes apartados se describe la dinámica celular durante distintos procesos fisiopatológicos del músculo y cómo la enfermedad puede perturbar estos mecanismos (56).

### 1.2.1. Regeneración

La dinámica celular durante la regeneración muscular implica varios tipos celulares. Las células encargadas de regenerar la fibra muscular son las células satélites (SC). Éstas se encuentran entre el sarcolema y la lámina basal en un estado de quiescencia. Una vez las SC se activan, entran en el ciclo celular y migran hasta las áreas dañadas del músculo donde dan lugar a los mioblastos, los cuales diferencian a miotubos para generar miofibras (57). El número total de SC se mantiene constante durante los ciclos de regeneración debido a la capacidad de las SC de auto-renovarse. Las SC se dividen mediante división celular asimétrica, dando lugar a dos células hijas, una SC destinada al restablecimiento de la quiescencia y un mioblasto, destinado a la diferenciación muscular. Esta capacidad de auto-renovación permite mantener las SC durante múltiples rondas de daño y reparación (58).

El ciclo de regeneración de las SC está controlado por los factores miogénicos reguladores (MRFs) que son: el factor miogénico 5 (Myf5), la proteína 1 de diferenciación miogénica (MyoD1), miogenina y el factor regulador miogénico 4 (Mrf4). Las SC quiescentes se caracterizan por la expresión de Myf5 junto con el factor de transcripción *paired box 7* (Pax7) (59). Estas células proliferan y expresan MyoD, entonces se convierten en mioblastos. Finalmente, los niveles de MyoD disminuyen cuando los mioblastos se fusionan para diferenciar a miotubos, que expresaran Mrf4 y miogenina (Figura 5) (60).



**Figura 5. Distintas poblaciones de células involucradas en la reparación muscular.** Tras un daño, las SC quiescentes se activan, diferencian y se fusionan para reparar la fibra dañada. Las SC quiescentes expresan Pax7 y Myf5 y después del daño muscular, aumentan los niveles de MyoD. En las fases finales, los mioblastos expresan genes de diferenciación como la miogenina. Los mioblastos diferenciados se fusionan para crear nuevas fibras (61).

Aparte de los MRFs, otras proteínas y vías de señalización controlan la quiescencia de las SC. La inhibición del ciclo celular de las SC está determinada por la expresión de inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas y por los factores de transcripción *Forkhead box O3* (FOXO3) y Notch. Además, factores extrínsecos del ambiente muscular (factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de adhesión y células que se encuentran en la matriz extracelular (ECM)) también controlan los diferentes estados de las SC. Las SC se mantienen en estado quiescente mediante la interacción con proteínas como las M-cadherinas y las integrinas (62).

En el músculo sano, las SC se encuentran en un estado quiescente hasta que un estímulo las hace proliferar y diferenciar a miotubos (60). Tras un daño, la fibra muscular libera moléculas que atraen células inflamatorias a la zona dañada, las cuales infiltran el músculo liberando diferentes citoquinas que actúan sobre las SC promoviendo su división. Además, las células inflamatorias eliminan restos celulares dejando la lámina basal intacta, la cual hará de esqueleto para la regeneración de la fibra. La regeneración muscular también requiere la acción de otro tipo de células, los progenitores fibro-adipogénicos (FAPs). Estas células liberan moléculas que favorecen la regeneración. Tanto las células inflamatorias como las células FAP actúan liberando

factores de crecimiento, citoquinas y quemoquinas para activar la proliferación de las SC y promover su división asimétrica (63).

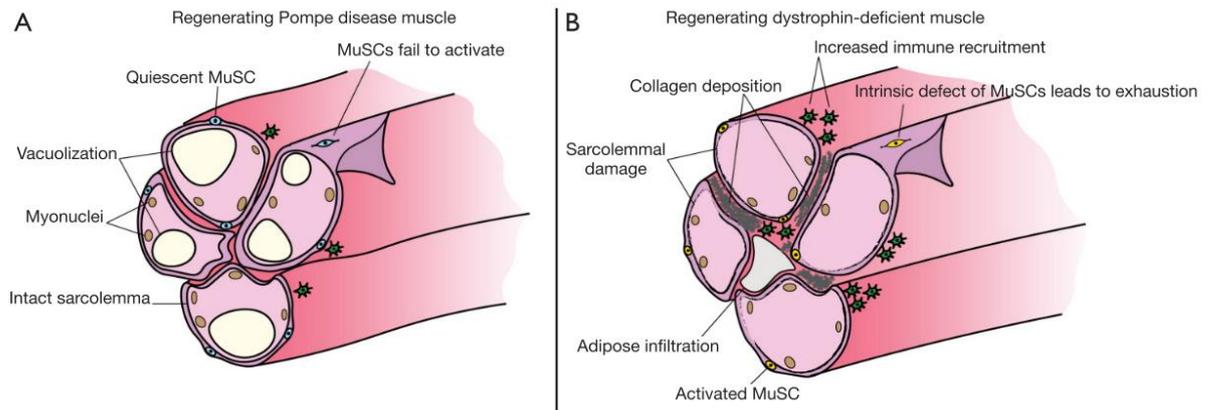
Para que las SC lleguen al lugar dañado necesitan migrar a través de la membrana basal y por tanto necesitan la degradación de la matriz extracelular (ECM). Las metaloproteasas (MMPs) presentan un papel esencial en la remodelación y mantenimiento de la ECM (64). El microambiente del músculo esquelético influye en la actividad de las MMPs, lo que conlleva a la inflamación persistente o a la regeneración (65). Las fibras regenerantes también secretan factores de crecimiento y citoquinas para activar a las SC y así aumentar la proliferación y diferenciación de éstas (66).

En las distrofias musculares la fragilidad del sarcolema lleva a la ruptura de las miofibras lo que conduce a un reclutamiento de células inflamatorias seguido de una respuesta regenerativa. No se conocen muy bien los factores que llevan a que el proceso de regeneración muscular falle en las distrofias musculares. Existen numerosos estudios con conclusiones contradictorias. Por una lado, hay autores que defienden la teoría de que los continuos ciclos de degeneración y regeneración de la fibra muscular llevan a un agotamiento en la capacidad proliferativa de las SC (67,68). Por otro lado, estudios demuestran que los niveles de SC estarían aumentados respecto al músculo sano, debido a la constante inflamación producida en las distrofias musculares (69–71). Aún y así, se ha demostrado que la fusión de mioblastos y la diferenciación en distrofias musculares es anormal comparada con la del músculo sano (72,73). Esto puede ser debido a la presencia de citoquinas pro-inflamatorias que se encuentran en el microambiente muscular, como el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), y que limitan la capacidad regenerativa de las SC (74). El daño muscular crónico perpetúa un estado inflamatorio intramuscular lo que facilita la degeneración de la fibra muscular y la expansión del tejido fibroso y adiposo. Además, el aumento de tejido fibroso en el músculo esquelético impide la regeneración muscular ya que supone una barrera mecánica que impide la migración y

fusión celular. En resumen, el microambiente final proinflamatorio y donde existe una expansión fibro-adiposa limita la regeneración muscular.

En el caso de las distrofinopatías, existe un mayor impedimento a la regeneración, debido a que las SC expresan el gen mutado. Se cree que la distrofina tendría un papel importante en la división asimétrica de las SC, por tanto el número de progenitores musculares estaría disminuido en las distrofinopatías, limitando la capacidad regenerativa en estas enfermedades (75).

El proceso de regeneración muscular en la enfermedad de Pompe es bastante diferente al que ocurre en las distrofias musculares. Durante la progresión de la enfermedad, el glucógeno se va acumulando en los lisosomas hasta provocar la ruptura de éste. Como consecuencia, el glucógeno se libera en el citoplasma reemplazando los elementos contráctiles de la célula muscular e impidiendo la función muscular. El daño muscular es básicamente intracelular, dejando el sarcolema y la lámina basal intacta. Debido a que no existe un daño en el sarcolema y no hay una ruptura miofibrilar, la respuesta inflamatoria no se activa en la enfermedad de Pompe. Por tanto, la falta de un daño robusto en el sarcolema contribuye a una inactividad de las SC (Figura 6). De hecho, el número de SC en las biopsias de pacientes con la enfermedad de Pompe es estable (76). La activación de las SC está ligada a la actividad autofágica. Después de un daño, la actividad autofágica aumenta para suplementar la demanda de trifosfato de adenosina (ATP) necesario para sostener la proliferación. Pero en la enfermedad de Pompe, la autofagia se encuentra bloqueada, bloqueado así también la activación de las SC. Por tanto, el microambiente del músculo esquelético en la enfermedad de Pompe no promueve las señales que activan las SC (77).

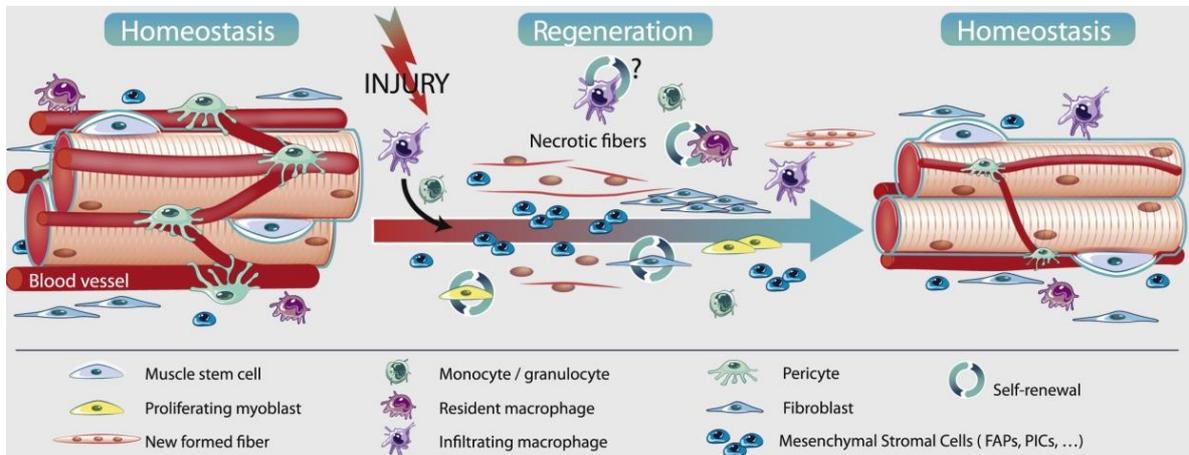


**Figura 6. Músculo esquelético en pacientes con diferentes miopatías.** A) Músculo en la enfermedad de Pompe y B) con distrofinopatía (B). Mientras que en las distrofinopatías el músculo presenta hiperactivación de las SC, inflamación crónica y remodelamiento del tejido, en la enfermedad de Pompe la respuesta regenerativa es deficiente (77).

### 1.2.2. Inflamación

La inflamación es un proceso esencial en el inicio y progresión de la remodelación de cualquier tejido, incluyendo al músculo. El proceso inflamatorio conlleva la degradación y reorganización de la ECM, ya que la nueva matriz extracelular será el soporte para la regeneración del músculo. Además, la respuesta inflamatoria es necesaria para la activación de las SC y la diferenciación de éstas. Los restos celulares y el contenido de las fibras dañadas liberado a la matriz extracelular activan el sistema inmunológico. La respuesta inflamatoria empieza con la activación de la inmunidad innata, específicamente de los mastocitos (62). Los mastocitos liberan histamina y citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), cuya función es la de atraer a más mastocitos y neutrófilos a la zona dañada. Los neutrófilos también se activan tras el daño muscular y actúan fagocitando los restos celulares necrotizados para así limpiar la zona dañada, pero también secretan citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , interferón gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ )), enzimas proteolíticas y especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan más daño en el tejido. Este efecto colateral de los neutrófilos depende de la gravedad del daño muscular y sirve para estimular la respuesta inflamatoria e inducir la infiltración de macrófagos a la lesión (78). Las células que

siguen a los neutrófilos son los monocitos, que migran hacia el lugar del daño donde diferencian a macrófagos, los cuales fagocitan restos celulares y liberan factores pro-inflamatorios (Figura 7). Estas células fagocíticas migran desde los vasos sanguíneos o capilares mediante la producción de MMPs (64).



**Figura 7. Activación de células inflamatorias durante la regeneración muscular.** Los monocitos migran a la zona dañada donde diferencian a macrófagos que mediante la liberación de distintas citoquinas, quemoquinas y las ROS promueven la regeneración muscular (61).

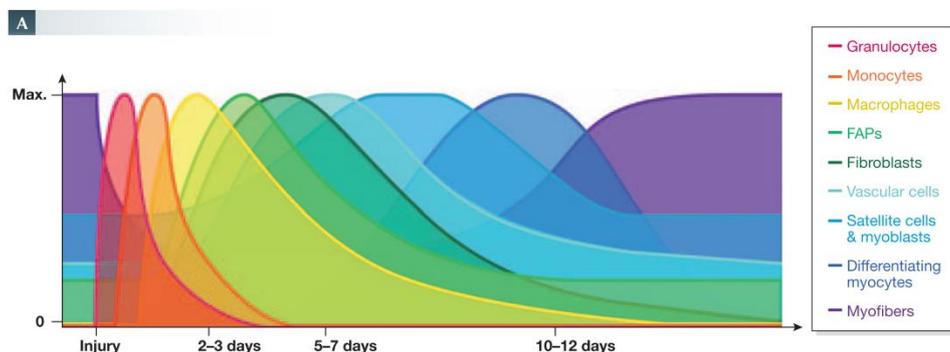
Los macrófagos presentan diferentes fenotipos: los M1 se activan por el receptor *toll-like receptor* (TLR) e IFN- $\gamma$ . Los TLR son receptores de la respuesta innata que mediante la unión a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), como pueden ser las fibras necróticas, activan factores de transcripción como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) e inducen la síntesis de moléculas de adhesión, quemoquinas y citoquinas inflamatorias, como la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 18 (IL-18) o interleucina 33 (IL-33) promoviendo la infiltración de células de la inmunidad innata en el tejido dañado (79,80). Otra de las moléculas que activa la señalización de los TLR es la trombospondina 1 (TSP-1) (81). La TSP-1 se secreta en respuesta a la inflamación por distintas células, como neutrófilos, macrófagos, células T pero también por los miotubos y mediante la unión al *toll-like receptor* 4 (TLR-4) estimula la expresión de NF- $\kappa$ B y de TNF $\alpha$  (29),(82,83). Tanto los macrófagos presentes en el músculo como las células musculares participan en la respuesta inflamatoria ya que expresan TLRs. Los macrófagos activados M1

producen ROS, quemoquinas (CCR7) y citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 o la IL-12 e IFN- $\gamma$ . La presencia de estas citoquinas aumenta el reclutamiento de los macrófagos M1 y células T en el lugar dañado, los cuales estimulan la producción de IL-6 en el músculo esquelético a la vez que participan en la activación de las SC y en la proliferación de mioblastos (84). Las células T infiltran el músculo gracias a los macrófagos y secretan varios factores de crecimiento y citoquinas para modular el microambiente del lugar dañado. Algunas de las citoquinas son IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , interleucina 4 (IL-4), IL-12 o IFN- $\gamma$  (85).

En una segunda fase hay un cambio en el fenotipo de los macrófagos que predominan en el músculo esquelético dañado, siendo principalmente de fenotipo M2, asociados con la reparación del tejido y la estimulación de la diferenciación y fusión de mioblastos (78). Los macrófagos M2 se activan por la IL-4 e interleucina 13 (IL-13) y producen citoquinas anti-inflamatorias como las propias IL-4, IL-13 y la interleucina 10 (IL-10). Además, los macrófagos M2 también secretan proteínas de la ECM como la fibronectina o el colágeno VI, moléculas que participan en la formación de una matriz provisional que servirá de soporte para la regeneración muscular (84).

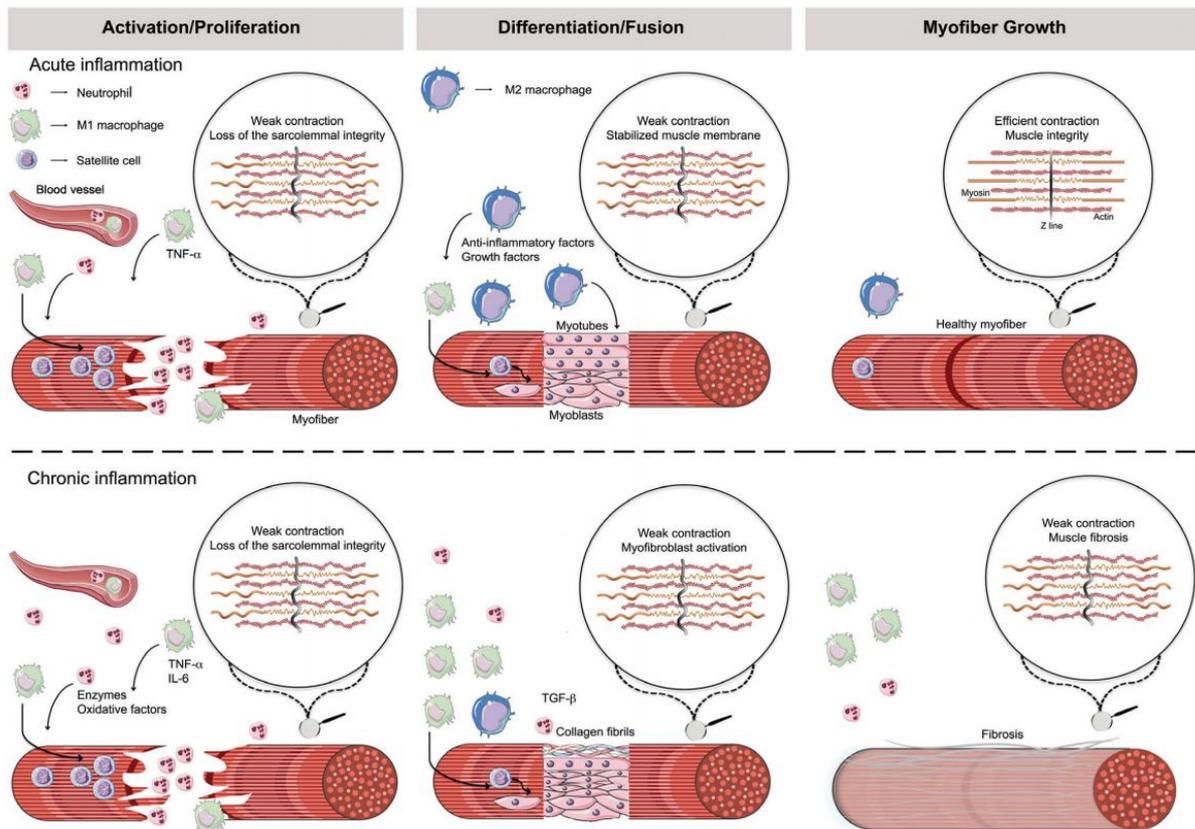
Los macrófagos juegan un papel importante regulando la producción de ECM mediante el control de los FAPs ya que el TNF- $\alpha$  producido por los macrófagos M1 induce la apoptosis de estas células, mientras que el TGF- $\beta$ 1 producido por los macrófagos M2 induce la supervivencia de las FAPs y la diferenciación hacia fibroblastos (84),(86). Junto con el aumento de macrófagos M2, las células T reguladoras (Tregs) también están aumentadas y secretan IL-10 y otras citoquinas que facilitan la conversión de macrófagos M1 a M2. Por tanto, la respuesta inflamatoria producida por los macrófagos es imprescindible durante la regeneración muscular para el desarrollo de nuevas miofibras, ya que están involucrados en la proliferación y diferenciación de las SC (Figura 8) (64),(87). Aunque la respuesta inflamatoria participa en la regeneración muscular, una respuesta inflamatoria crónica se asocia

con una activación y diferenciación de las SC deficiente, además de una liberación de citoquinas responsables de la expansión del tejido fibrótico (84),(88).



**Figura 8. Aparición en el tiempo de células implicadas en la inflamación.** Presencia relativa de células inmunológicas, fibróticas y miogénicas tras un daño muscular (62).

En el caso del músculo distrófico, como el daño es crónico y el ciclo necrosis/regeneración es recurrente, la respuesta inflamatoria también lo es. Esto provoca la activación de la inmunidad innata mediante la liberación crónica de DAMPs por las fibras necróticas y la presencia persistente de neutrófilos y monocitos que producen proteasas, citoquinas y ROS causando un daño aun mayor y generando una respuesta inflamatoria prolongada (89) (Figura 9). Los receptores TLR se encuentran aumentados en las distrofias musculares, lo que conlleva a una activación continuada promoviendo un microambiente pro-inflamatorio en el músculo. Uno de los tipos de TLR más estudiados en distrofias musculares son los TLR-4 y *toll-like receptor 7* (TLR7), que actúan vía NF- $\kappa$ B y participan en la inflamación crónica del músculo y en la progresión de la fibrosis en músculo distrófico (80),(90). Los macrófagos adoptan un fenotipo híbrido produciendo grandes cantidades de TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-6. Estas citoquinas se encuentran aumentadas en el inicio de la enfermedad en pacientes con DMD y van reduciéndose con la progresión de la enfermedad (91). Además, los macrófagos M2 inducen un aumento de citoquinas anti-inflamatorias que promueven la activación de eosinófilos, células que promoverán la fibrosis muscular. No sólo los macrófagos secretan citoquinas, las fibras también producen IL-1, interleucina 5 (IL-5) y TNF- $\alpha$  para promover un aumento aún mayor de la producción de citoquinas (92).



**Figura 9. Efectos del proceso inflamatorio en el daño agudo y crónico en la regeneración muscular.** Mientras en el daño agudo la inflamación promueve la reparación de las miofibras, tras un daño crónico la respuesta inflamatoria se mantiene elevada y consecuentemente se produce un aumento de tejido fibrótico (78).

En el caso de la enfermedad de Pompe, no se han observado infiltrados inflamatorios en tejido de pacientes, excepto en aquellos que están en fases más tardías de la enfermedad (76). Esto seguramente sea debido a que no existe un daño en el sarcolema, por tanto no hay señales que promuevan una respuesta inflamatoria en la zona dañada. La diferencia de respuesta en distrofias musculares y miopatías metabólicas se ha estudiado a nivel de citoquinas inflamatorias. Uno de los estudios muestran un incremento en IL-1 $\beta$  en modelos animales de distrofinopatías y diferlinopatías pero no en modelos de enfermedad de Pompe (79).

### 1.2.3.Fibrosis

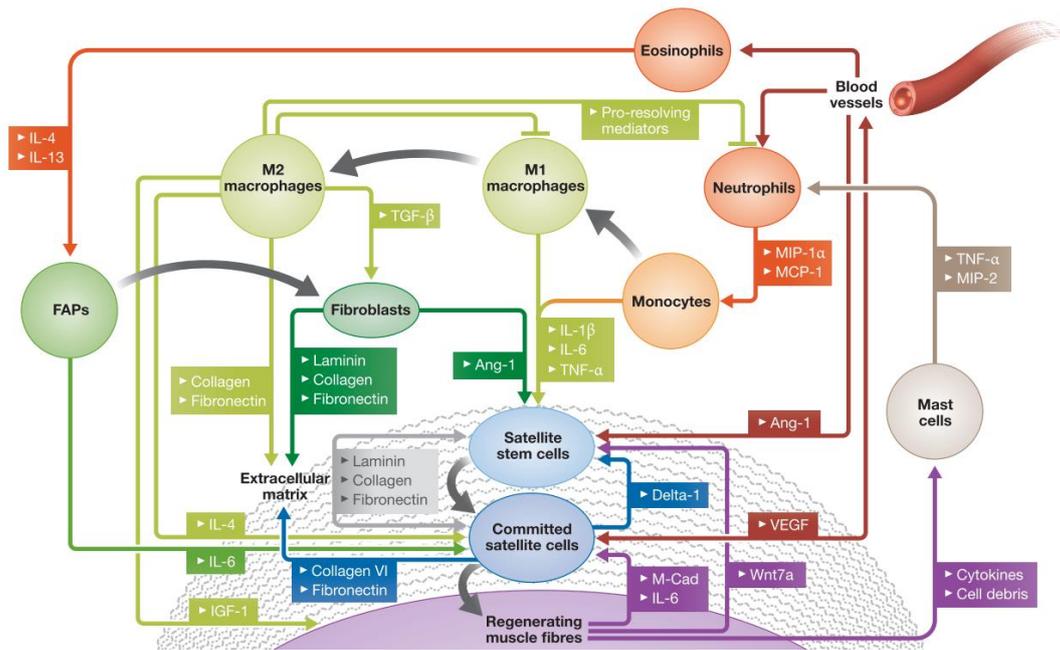
Durante la regeneración muscular, la ECM forma un complejo dinámico de moléculas que interaccionan con el sarcolema y elementos del citoesqueleto (93). La ECM tiene

la capacidad de reorganizarse ya que presenta una transición que sirve para preservar la integridad del tejido hasta que las fibras se regeneran correctamente. La degradación de la ECM es imprescindible para facilitar la migración de células miogénicas, inflamatorias y fibroblastos a la zona dañada. Las células principales productoras de proteínas de la ECM son los fibroblastos y las FAPs (94).

Los fibroblastos son células no totalmente diferenciadas que mantienen la capacidad de activarse y diferenciarse a miofibroblasto. El fenotipo de miofibroblasto se caracteriza por la expresión de actinina alfa de músculo liso ( $\alpha$ SMA), una elevada producción de ECM y su resistencia a la apoptosis (95). Los fibroblastos liberan y responden a citoquinas como el TGF $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) IL-6, IL-3 o IL-33 producidas por células inflamatorias. Esta estimulación promueve la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y además promueve la activación y migración de células inflamatorias hacia el tejido conectivo para inducir la regeneración. Tanto fibroblastos como miofibroblastos producen componentes de la ECM como el colágeno I y III, fibronectina, elastina, proteoglicanos y laminina. Estas proteínas sirven para estabilizar el tejido y hacen de soporte para la regeneración de las nuevas fibras (95).

Las FAPs son precursores mesenquimales que pueden diferenciar tanto a fibroblastos como a adipocitos. Las FAPs se mantienen en un estado quiescente, pero tras un daño muscular proliferan y secretan colágeno, estimulando la miogénesis. Los eosinófilos tienen un papel importante en la regulación de las FAPs, ya que se reclutan en el área dañada y secretan IL-4. La IL-4 inicialmente promueve la proliferación de las FAPs para reparar el músculo lesionado mediante la fagocitosis de restos de fibras necróticas (Figura 10) (57). Además, promueve la supresión de la actividad transcripcional de los receptores activados por proliferadores peroxisómicos gama (PPAR $\gamma$ ) y, por tanto, inhibe la diferenciación de las FAPs en adipocitos. La interleucina 15 (IL-15) es liberada por las miofibras y está implicada en la proliferación de las FAPs a través de la activación de la vía Jak-STAT que promueve la

regeneración de las miofibras. Además, la IL-15 también previene la diferenciación adipogénica de las FAPs después de un daño muscular (96). Tras un proceso fisiológico de regeneración, el exceso de FAPs es eliminado mediante estímulos producidos por las SC y por las células inflamatorias, como la liberación de TNF- $\alpha$  que induce su apoptosis, manteniendo de este modo un equilibrio entre regeneración muscular y fibrosis (97).



**Figura 10. Señales extrínsecas del microambiente del músculo esquelético.** Las señales paracrin (flechas finas) regulan el reclutamiento, proliferación y diferenciación (flechas gruesas) de cada tipo celular (62)

Tanto las FAPs como los fibroblastos expresan receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo alfa (PDGFR $\alpha$ ) y no expresan el marcador CD56. Además, los fibroblastos expresan el factor de transcripción 4 (Tcf-4) y el marcador de fibroblastos 7 (TE-7) (98). Ambos tipos celulares influyen de algún modo a las SC: los fibroblastos promueven la proliferación de las SC evitando su diferenciación, mientras que las FAPs estimulan la diferenciación a miotubo (62).

En las distrofias musculares, las SC y las células inflamatorias no producen factores que controlan la apoptosis de las FAPs, provocando una actividad alterada de estas y por tanto una excesiva producción de ECM y de acumulación de tejido adiposo (97).

Uno de los factores que promueven la acumulación de FAPs es la IL-6. Los fibroblastos también presentan estas características, ya que secretan factores de crecimiento y citoquinas contribuyendo a una mayor producción de ECM. La activación de los fibroblastos es persistente debido a un daño muscular crónico. Los macrófagos M2 expresan niveles altos de TGF- $\beta$ , promoviendo una activación constante de fibroblastos y evitando la apoptosis de las FAPs. Esto lleva a una producción acelerada de ECM y en consecuencia a una fibrogénesis permanente (93).

En el caso de la enfermedad de Pompe, debido a la ausencia de necrosis, inflamación y mecanismos de regeneración, el aumento de tejido fibroso no es una característica de la enfermedad y raramente se observa en las biopsias musculares (99), excepto, en biopsias de pacientes en etapas severas de la enfermedad, donde se ha podido observar el reemplazo de músculo por tejido conectivo y graso. Además, los estudios de resonancia magnética muestran un reemplazo progresivo de las fibras musculares por tejido graso en pacientes con enfermedad de Pompe (100).

#### **1.2.3.1. Factores implicados en la activación de fibroblastos**

La mayoría de los factores fibrogénicos los producen células inflamatorias, mesenquimales y las propias fibras musculares dañadas. Uno de los más potentes es el TGF- $\beta$ . Existen 3 subtipos de TGF- $\beta$  conocidos como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. Entre ellos, el TGF- $\beta$ 1 ha sido el más estudiado en el proceso de activación de fibroblastos de músculo esquelético (101).

El TGF- $\beta$  se libera por infiltrados inflamatorios, células mesenquimales o la propia fibra muscular y activa la transcripción de más factores fibrogénicos, como el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y el colágeno (102). La activación de las vías de TGF $\beta$  en los fibroblastos, influencia la proliferación y diferenciación de las SC, inhibiendo la activación de los factores reguladores miogénicos. Además, el TGF $\beta$  actúa sobre los fibroblastos y miofibroblastos promoviendo su proliferación, migración,

producción de matriz extracelular y de señales quimiotácticas que reclutan células inflamatorias al lugar del daño (95).

El CTGF se expresa y se libera por los fibroblastos. Interacciona con una gran variedad de receptores y ligandos extracelulares como también con proteínas de la ECM induciendo la expresión de colágeno I, integrina  $\alpha 5$  y fibronectina. El CTGF tiene un papel importante en la fibrosis debido a que está regulado por TGF $\beta$  y por tanto amplifica los efectos del TGF $\beta$  (103).

Las plaquetas, células endoteliales, células musculares y macrófagos producen PDGF, que actúa en fibroblastos induciendo su proliferación, diferenciación y producción de ECM (95).

#### **1.2.3.2. PDGF**

La vía del PDGF está implicada en proliferación celular, migración o tumorigenesis. Tiene una función fisiológica en varios tipos de células, pero sobre todo en aquellas de origen mesenquimal (104).

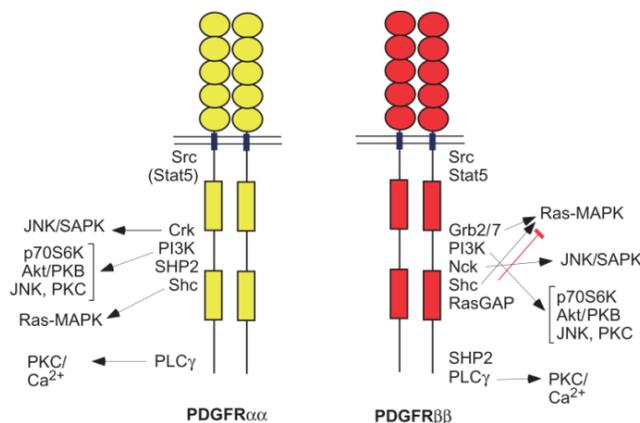
La familia PDGF consiste en 4 ligandos, PDGFA-D que forman 5 factores de crecimiento distintos: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB- PDGF-CC y PDGF-DD. Estos factores se unen a sus propios receptores PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ . Los receptores pueden formar heterodímeros o homodímeros y cada ligando muestra diferente afinidad por los receptores  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  y  $\beta\beta$  (105). Las uniones demostradas *in vivo* son la del PDGF-AA y PDGF-CC al PDGFR $\alpha$  y PDGF-BB y PDGF-DD al PDGFR $\beta$  (104),(106,107). Los ligandos PDGF son factores de crecimiento que actúan de forma tanto paracrina como autocrina y promueven diferentes respuestas celulares. La expresión de los PDGFR en células mesenquimales es baja, pero aumenta durante procesos inflamatorios. Varios factores inducen su expresión, como el TGF $\beta$ , el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) o el TNF- $\alpha$  (107).

Los PDGFR son receptores tirosina quinasa. Cada receptor está compuesto de 5 repeticiones de inmunoglobulinas en el lugar de unión a ligando y un dominio tirosina

quinasa en la región citoplasmática. Cuando el ligando se une al receptor, éste dimeriza activando el dominio tirosina quinasa, el cual autofosforila diferentes residuos de tirosina en el dominio citoplasmático del receptor, creando sitios de unión para otras proteínas de señalización y adaptadores que inician la transducción de la señal (105).

#### 1.2.3.2.1. Respuesta señalización PDGF

El PDGFR $\alpha$  y el PDGFR $\beta$  activan varias vías de señalización, como la vía de las MAPK, fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y fosfolipasa C gama (PLC- $\gamma$ ) que promueven la transcripción de diferentes genes implicados en la proliferación y diferenciación celular, inhibición de la apoptosis, movilización del calcio intracelular y movilidad celular (107). Los PDGFR también interactúan con integrinas, promoviendo la proliferación y migración, además de promover la interacción con adhesiones focales. Las proteínas con las que interactúa el PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$  no son exactamente las mismas, lo que resulta en diferentes vías de activación y por tanto diferencias funciones *in vivo* (Figura 11) (105).



**Figura 11. Vías de señalización PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ .** La activación de los receptores una vez se une el ligando PDGF presenta diferencias de activación molecular según el receptor (105).

#### 1.2.3.2.2. Respuesta celular PDGF

La familia PDGF está implicada en diversos procesos del desarrollo, como en la angiogénesis, espermatogénesis o el desarrollo alveolar. Las funciones de PDGF están implicadas en una amplia gama de enfermedades, como en arterioesclerosis, hipertensión pulmonar, retinopatías isquémicas. Además, está conectado a procesos

fibróticos de diferentes enfermedades, como en el hígado cirrótico, fibrosis hepática, o fibrosis pulmonar. La implicación con la fibrosis se debe a que el PDGF promueve la proliferación de fibroblastos (107). Varios estudios han demostrado la implicación del PDGF en las distrofias musculares, específicamente del PDGF-AA y PDGF-BB (108). En el caso del PDGF-AA, se ha estudiado su función como factor regulador de procesos fibróticos: las FAPs expresan PDGFR $\alpha$  y proliferan tras un daño muscular (109), el músculo esquelético de ratones que expresan constitutivamente el PDGFR $\alpha$  presentan un aumento de tejido fibrótico (110) y tratamientos con antagonistas del PDGFR $\alpha$  en modelo murino de DMD reducen la fibrosis muscular (111). En cambio, existe más controversia con el PDGF-BB y su papel en el músculo esquelético. Algunos estudios sugieren que el PDGF-BB promovería procesos fibróticos (112), mientras otros autores demuestran que el PDGF-BB induce la proliferación de SC y promueve la regeneración muscular (113,114).

## **1.3. Tratamientos**

---

Se han desarrollado varias estrategias terapéuticas para el tratamiento de las distrofias musculares y miopatías metabólicas. Algunas estrategias se basan en reestablecer la expresión de la proteína disfuncional pero otras se centran en la búsqueda de fármacos para revertir el estado fisiopatológico de la enfermedad.

### **1.3.1. Terapias celulares**

Las terapias celulares se basan en la administración de células miogénicas (SC o mioblastos) procedentes de un control sano en el músculo distrófico con el objetivo que las células liberadas se fusionen y puedan repoblar el músculo distrófico (115). La inyección intramuscular de SC procedentes de controles sanos en el músculo distrófico de pacientes con DMD reestableció la expresión de distrofina, pero con una eficiencia muy baja que no se reflejaba en ningún cambio funcional. Las limitaciones que se encontraron fue una baja supervivencia y migración celular de las células

inyectadas, además de un rechazo inmunológico (116). El trasplante de mioblastos *wild type* (WT) junto a un fármaco inmunosupresor en ratones SJL, modelo murino de LGMD-R2 causó la recuperación de disferlina en las fibras musculares (117).

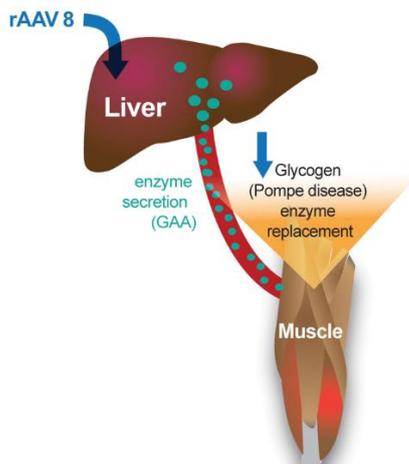
### 1.3.2. Estrategias genéticas

La terapia génica consiste en la transferencia de un gen funcional en el músculo deficiente. La mayoría de estudios utilizan los adenovirus y virus adeno-asociados (AAV) como vectores para la introducción del gen correcto (118). Los adenovirus presentan varias limitaciones como la activación de la respuesta inmunológica y una expresión génica transitoria. Los AAV, a pesar de su baja capacidad de clonaje, se caracterizan por una respuesta inflamatoria e inmunológica más reducida que la producida por los adenovirus (119).

Se han estudiado diferentes estrategias para reintroducir la distrofina en músculos deficientes de ésta, pero debido al gran tamaño del gen, se han creado mini y micro-distrofinas sintéticas codificantes para las regiones imprescindibles del gen que ha permitido su empaquetamiento en los AAV (120,121). El gen *DYSF*, también es de gran tamaño y no puede ser clonado en su totalidad dentro de un AAV. Mini-disferlinas empaquetadas en AAV pueden reparar lesiones en el sarcolema en un modelo de ratón con disferlinopatía aunque no sean totalmente funcionales (122).

En la enfermedad de Pompe, las estrategias se basan en restaurar la expresión de la enzima recombinante humana (rhGAA). La primera estrategia se centra en la inyección sistémica de AAV1 en el diafragma de los (123). Los resultados mostraron una baja efectividad debido posiblemente a que la mayoría de los pacientes participantes estaban en una fase muy avanzada de la enfermedad (124,125). La segunda estrategia consiste en aprovechar la elevada biodistribución del AAV8 en el hígado, provocando la liberación continua de GAA que se liberaría de forma sistémica alcanzando todos los órganos (Figura 12)(45),(126). Actualmente existen dos ensayos

clínicos en pacientes, uno de ellos está reclutando pacientes (NCT03533673 ) y en otro en fase de diseño (127,128).



**Figura 12. Terapia génica en la enfermedad de Pompe.** La transducción hepática con vectores AAV8 ha logrado la corrección bioquímica mediante el reemplazo de la GAA y la disminución de glucógeno en músculo (129).

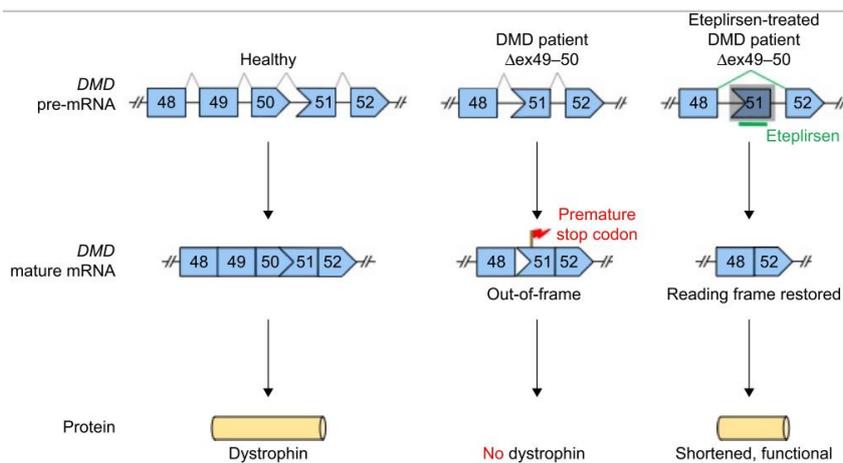
### 1.3.2.1 Corrección gen mutado

La edición del genoma se basa en el uso de nucleasas dirigidas a la mutación causante de la enfermedad. El sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas asociado a la proteína enzimática 9 (CRISPR-Cas9) consigue una edición precisa y rápida del genoma mediante la corrección de mutaciones causantes de la enfermedad (130). Estudios *in vivo* han conseguido la edición de la mutación en el gen de la distrofina en modelos murinos de DMD recuperando la función muscular (131). En la LGMD-R2 se ha conseguido editar una mutación sin sentido a partir de células madre pluripotentes (iPSCs) derivadas de un paciente (132). Y la edición de la enzima GAA también se ha conseguido en iPSCs derivadas de pacientes con la enfermedad de Pompe (133).

### 1.3.2.2. Salto de exón

Otro método para modificar el producto génico es el salto de exón (*exon skipping*) mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (AOs). Los AOs se unen al transcrito de ARN mensajero precursor (pre-mARN) para provocar un salto de exón de los exones mutados y así restablecer el marco de lectura ocasionado por deleciones o por codones de terminación (134). De esta forma se obtiene una proteína truncada pero

parcialmente funcional (119). Los AOs más comunes son los de fosforotioato (PS) y los oligómeros de morfolino fosforodiamidato (PMO). Recientemente se ha aprobado viltolarsen© en Japón (135) y golodirsén© en USA (136), 2 PMOs dirigidos al exón 53 (mutado en el 10% de pacientes con DMD). Actualmente se están haciendo ensayos clínicos con PMOs (eteplirsén©) dirigido al exón 51, el cual presenta mutaciones en un 13% de los pacientes con DMD (Figura 13) (137). Aunque inicialmente los beneficios de eteplirsén© parecían prometedores, resultados de ensayos clínicos mostraron una baja expresión de distrofina en músculo junto con pocos beneficios clínicos (138). Por este motivo se está estudiando la introducción de modificaciones químicas mediante la conjugación a péptidos que facilitarían la absorción por las fibras musculares (139). Son conocidos como PPMOs (PMO unidos a péptidos) y están actualmente en fase de ensayo preclínico.



**Figura 13. Mecanismo de acción del eteplirsén©.**

Reconoce específicamente el exón 51 y se une a él saltándose el exón 51 del transcrito de mRNA. Esto provoca la restauración del marco de lectura permitiendo la traducción de una proteína truncada, pero funcional (140).

El exón 32 de la disferlina (mutado en el 4% de pacientes con LGMD-R2) también ha sido diana de la terapia con AOs (141), consiguiéndose un 10% de función respecto a la disferlina normal (142).

Uno de los problemas de las estrategias genéticas es la correcta liberación de las moléculas al músculo, ya que hay que evitar la degradación enzimática y la entrada en los lisosomas a la vez que aumentar la captación intracelular (143). La nanomedicina se encarga de la búsqueda de partículas que formen complejos estables con el

producto, que pueda estar en la circulación sistémica, llegar a tejidos específicos y liberar el fármaco de manera controlada (144).

### **1.3.2.3. Supresión codón terminación**

El ataluren es un fármaco que induce a los ribosomas a saltarse el codón de terminación, permitiendo la traducción de la proteína. El 15% de los pacientes con DMD tienen mutaciones que provocan codones de terminación prematura. El ataluren se testó en pacientes con DMD y se observó un incremento del 11% en la producción de distrofina (145). Aunque existen varios efectos secundarios, ataluren se aprobó en Europa en 2014 para pacientes DMD con mutaciones sin sentido, con la finalidad de retrasar la evolución de la enfermedad (146). El ataluren también ha sido testado en miotubos procedentes de pacientes con disferlinopatía con mutaciones causantes de un codón de terminación prematuro. Los resultados mostraron una acumulación de un 15% de disferlina funcional en músculo (147).

### **1.3.3. Sobreexpresión/reemplazo de la proteína mutada**

Otra de las estrategias farmacológicas se basa en el aumento de expresión de las proteínas mutadas para poder conseguir una mínima función proteica.

La utrofina presenta gran similitud con la distrofina en cuanto a organización estructural y propiedades de unión al complejo DGC (120), (148), por este motivo se realizaron ensayos clínicos con un regulador transcripcional de la utrofina pero no se vieron efectos en los pacientes (149).

Otra aproximación terapéutica estudiada en la DMD es la inhibición del proteasoma. El proteasoma es un complejo proteico que reconoce proteínas que no se pliegan o ensamblan correctamente. Funciona reconociendo proteínas marcadas con una cadena de poliubiquitina que son degradadas por proteasas del complejo con distintas actividades proteolíticas: quimiotripsina (CT-L), caspasa (C-L) y tripsina (T-L) (150). Se ha visto que los sistemas de degradación de proteínas, entre los cuales se encuentra

el sistema ubiquitina proteasoma y la autofagia, se encuentran aumentados en las distrofias musculares (151). Se ha reportado que el inhibidor de proteasoma MG-132 rescata parcialmente la expresión del DGC en el ratón *mdx* (152). Otro inhibidor, el bortezomib, promovió el aumento de localización de distrofina mutada y de proteínas asociadas a éstas en miotubos procedentes de pacientes con BMD (153). Aunque no es una terapia específica de ninguna patología, no se ha testado su efecto en otras distrofias.

En la LGMD-R2 se ha estudiado el aumento de disferlina con el tratamiento de vitamina D3 en pacientes portadores. El promotor del gen de la disferlina contiene elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE). Por tanto, la vitamina D3 promueve el aumento de la expresión de disferlina mediante la unión a su receptor. Se ha demostrado que la vitamina D3 aumenta el transcrito de disferlina tanto en músculo esquelético como en monocitos circulantes en sangre (154).

En la enfermedad de Pompe la terapia de ERT mediante el uso de la rhGAA, alglucosidasa alfa (Myozyme®), es el único tratamiento aprobado. La ERT se usa tanto en la forma infantil como en la adulta (155,156) causando un aumento de la supervivencia en la forma infantil y una ralentización de la progresión de la enfermedad (125). La ERT presenta varias limitaciones: la baja respuesta al fármaco por parte del músculo y la respuesta inmunológica hacia la rhGAA (157). El pH neutro de la sangre también limita la estabilidad de la rhGAA, ya que es una hidrolasa ácida que es estable y activa a pH ácidos (158–162). Se están desarrollando ERT de nueva generación como el avalglucosidasa alfa (NeoGAA), que presenta modificaciones químicas que mejoran la unión al receptor de M6P, lo que resulta en una mejor señalización a músculo (163). Ensayos en pacientes tratados con NeoGAA han demostrado una mejor función muscular y pulmonar en comparación con los tratados con rhGAA (164). En el momento actual se está realizando un ensayo clínico en fase III randomizado doble ciego en el que se compara avalglucosidasa alfa (neoGAA) con alglucosidasa alfa (Myozime) (NCT02782741). Otro fármaco en estudio

que ha demostrado mejoras comparado con rhGAA es el AT-GAA (formalmente conocido como ATB200/AT2221), una combinación de productos compuesto por la rhGAA con un mayor contenido de M6P que se administra junto a una chaperona que estabiliza la enzima manteniendo su actividad enzimática a pH neutro. Esta combinación ha demostrado presentar una mejor liberación en músculo, mejorías en la función muscular y respiratoria y una mejora en parámetros de calidad vital (165,166). En el momento actual se está realizando un ensayo clínico en fase III randomizado doble ciego en el que se compara ATB2000/AT2221 con alglucosidasa alfa (Myozime) (NCT03729362).

### **1.3.4. Aproximaciones farmacológicas**

El conocimiento de la fisiopatología a nivel molecular promueve la búsqueda de nuevos compuestos que puedan mejorar aspectos funcionales y morfológicos del músculo.

La terapia más usada en pacientes DMD y BMD se basa en los corticosteroides, los cuales han demostrado eficiencia ralentizando la progresión, a pesar de los efectos secundarios (aparición cushingoide, alteración del sistema nervioso, síntomas gastrointestinales, trastornos metabólicos, osteoporosis con mayor riesgo de fracturas vertebrales) (167). Los corticosteroides más usados en el tratamiento de la DMD son la prednisona y el deflazacort (168). Ambos fármacos son efectivos mejorando la fuerza y función muscular (169,170). El mecanismo podría ser mediante la inhibición de NF- $\kappa$ B (171). El tratamiento con corticosteroides no es efectivo en los pacientes con LGMD-R2 (172).

#### **1.3.4.1. Estrategias para inhibir la fibrosis**

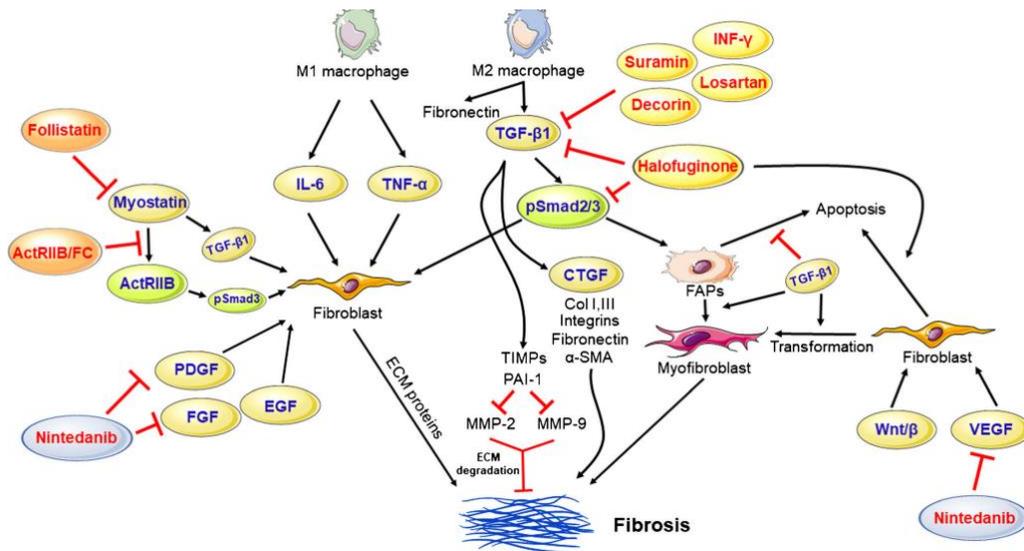
El aumento de tejido fibrótico dificulta el acceso de fármacos al propio músculo. Las estrategias para combatir la fibrosis se basan en inhibir vías implicadas en este proceso. La mayoría de los fármacos antifibróticos estudiados son inhibidores del

TGF- $\beta$ . Un ejemplo es el losartan, un antagonista del receptor de la angiotensina II que mediante el bloqueo de este receptor bloquea la activación del TGF- $\beta$ 1. La administración de losartan en modelos animales de DMD reduce la fibrosis, pero no produce ningún cambio en la función muscular ni en la regeneración (173). Por el contrario, el uso de losartan en el modelo murino de LGMD-R2 aumenta la fibrosis muscular exacerbando el desgaste muscular (174). La folistatina es otro fármaco antagonista de la familia del TGF- $\beta$ , que inhibe varios miembros de esta familia incluyendo la miostatina. Se estudió el efecto de la expresión de folistatina en pacientes BMD mediante la inyección intramuscular de AAV codificante para la folistatina y se observó un aumento de la masa muscular y una mejora en la prueba funcional de los metros recorridos durante 6 minutos (6MWT) (175). Debido a los resultados positivos obtenidos, se decidió aplicar el mismo método para pacientes DMD (176). El efecto de la folistatina en modelos murinos de LGMD-R2 no mostró mejoras funcionales (177). La halofuginona es una molécula bloqueante de la activación de Smad3 (factor de transcripción de la vía de TGF- $\beta$ ) que pese a provocar una reducción significativa de la fibrosis y un aumento de la fuerza muscular, provoca efectos adversos en pacientes con DMD, por lo que se suspendió el ensayo clínico (178). El efecto de la halofuginona también se estudió en el modelo murino de LGMD-R2 y los resultados en músculo esquelético mostraron un menor contenido de colágeno, menor número de núcleos centrales y menor número de macrófagos en aquellos animales tratados comparados con los no tratados (179).

El bloqueo del CTGF se ha estudiado mediante anticuerpos monoclonales en un modelo murino de DMD. Los resultados muestran que los ratones mejoraron la resistencia al ejercicio, la fuerza muscular y redujeron la degeneración muscular y la fibrosis (191). Actualmente se está evaluando el efecto del bloqueo de CTGF en un ensayo clínico de fase II.

La inhibición del PDGF se ha realizado utilizando inhibidores tirosina quinasa. El imatinib bloquea PDGFR y promueve la reducción de fibrosis e inflamación junto con la

mejora de la función muscular en el ratón *mdx* (modelo murino de DMD) (111). El crenolanib y nilotinib son también inhibidores tirosina quinasa que han mostrado reducción de fibrosis en el ratón *mdx* (181,182). El nintedanib es un inhibidor de los receptores FGF, PDGF y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Figura 14), que reduce la proliferación de los fibroblastos *in vitro* además de mejorar la función muscular y reducir la fibrosis en ratones *mdx* (183).



**Figura 14. Diagrama esquemático que muestra factores inhibidores de fibrosis en el músculo esquelético.** Tanto el losartan como la halofuginona inhiben la vía de TGF-β. La follistatina inhibe directamente la miostatina y el nintedanib bloquea los receptores VEGF, FGF y PDGF (184).

La terapia génica se postula como la cura definitiva para las enfermedades monogénicas, aunque un aspecto a mejorar es la liberación en músculo. Los cambios morfológicos producidos en músculo, como la sustitución de tejido muscular por tejido fibrótico y graso, dificulta la entrada del fármaco. Esta sustitución es un proceso irreversible, por tanto, la terapia génica en pacientes con alto contenido de tejido graso y poco tejido muscular presenta pocas probabilidades de ser efectivo. Esto hace que los candidatos para una posible terapia génica sean solo aquellos pacientes en que la enfermedad no ha progresado demasiado y el estado del músculo no presente grandes cambios histológicos. Por este motivo, el conocimiento de las vías implicadas en la degeneración muscular es importante para poder desarrollar nuevos fármacos

que interfieran y reelantizen estos procesos. La combinación de la terapia génica junto con fármacos que interrumpan procesos de degeneración, inflamación o fibrosis promoverían una mejor eficiencia terapéutica.

## **1.4. Biomarcadores**

---

Los biomarcadores son indicadores de una condición biológica, estado patogénico o de respuesta a un tratamiento farmacológico. En las miopatías se utilizan distintas pruebas funcionales para evaluar el estado del paciente y ver cómo responde al tratamiento. La prueba más utilizada es la de los 6MWT ya que permite monitorizar la progresión de la enfermedad a través de los metros recorridos a pie por el paciente. Esta prueba presenta varias limitaciones como: la gran variabilidad existente entre individuos, el componente voluntario de cada paciente a la hora de realizar la prueba, la falta de sensibilidad de la prueba y que solo la pueden realizar pacientes ambulantes (185). Por este motivo, la búsqueda de nuevos biomarcadores en sangre presenta gran utilidad debido a que son más accesibles y menos invasivos en pacientes, constituyen una medida objetiva, permiten seguir la progresión de la enfermedad, monitorizar la eficiencia de nuevos tratamientos y predicen cambios fisiopatológicos tempranos para detectar el inicio de un tratamiento y la respuesta al tratamiento.

### **1.4.1. Composición del tejido**

La resonancia magnética cuantitativa (qMRI) permite estimar la fracción grasa de cada músculo. En distrofias musculares, el resultado de la qMRI correlaciona con diferentes pruebas funcionales, y con la progresión de la enfermedad (186–191), y permite evaluar la progresión tanto en pacientes ambulantes como no ambulantes, en los que algunas pruebas funcionales no se podían realizar. En la enfermedad de Pompe, la MRI predice la función muscular en pacientes asintomáticos, antes de analizar los resultados de las pruebas funcionales (192). Los beneficios de la qMRI es que no

dependen de la voluntad, atención o coordinación de los pacientes. Como desventaja, los pacientes tienen que estar inmovilizados durante un largo tiempo y la prueba es costosa (185).

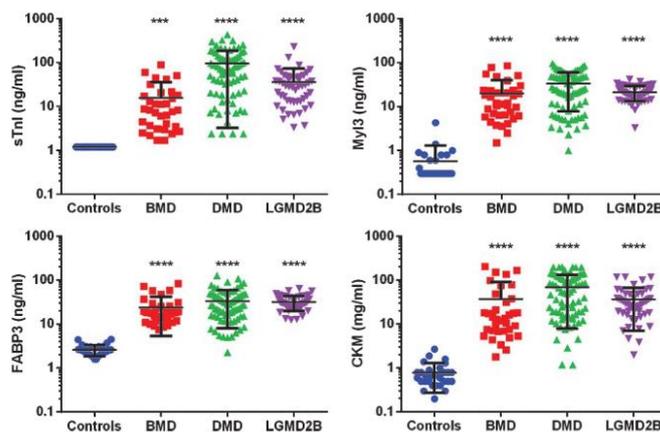
### **1.4.2. MicroARNs (miARNs)**

Los microARN (miARNs) funcionan como silenciadores genéticos y modulan la síntesis de proteínas específicas (193). Distintos estudios han evaluado 3 miARNs (miR-1, miR-133 y miR-206) en suero de diferentes distrofias musculares. El miR-133a y miR-206 están aumentados en suero de pacientes DMD, BMD y enfermedad de Pompe, mientras que en las LGMD están aumentados el miR-1 y el miR-133a (194). El miR-206 está aumentado en suero de pacientes Pompe sintomáticos comparado con los asintomáticos, lo que lo hace candidato para el seguimiento de pacientes pre-sintomáticos (195).

### **1.4.3. Proteínas y metabolitos**

Varias proteínas específicas de músculo se han detectado en fluidos biológicos como es el suero, el plasma o la orina. Presentan grandes ventajas en la búsqueda de biomarcadores ya que se obtienen de fluidos biológicos y son más estables que los miARNs. El biomarcador más utilizado son las CKs serológicas, que miden el daño muscular y se utilizan como prueba diagnóstica, junto con la histología de las biopsias musculares. Las CKs se encuentran muy elevadas en pacientes con miopatías pero tienen varias desventajas ya que presentan mucha variabilidad y fluctuaciones según la actividad diaria o ejercicio (92),(196). Diferentes proteínas miofibrilares están elevadas en suero de DMD comparado con controles, como la cadena de miosina ligera-1 (MYL1), cadena de miosina ligera-3 (MYL3), la titina (TTN), la miomesina-3 (MYOM3), filamina C (FLNC) la actina esquelética alfa 1 (ACTA1), troponina esquelética I (sTnl), troponina T tipo 3 (TNNT3) y plastina-2 (LCP1). El aumento de estas proteínas en suero se ha descrito en varios estudios y sugiere que su liberación

a la circulación sanguínea es el resultado de la actividad proteolítica durante el proceso de inflamación y necrosis (197). Dentro de este grupo de proteínas, la sTnl, la MYL3 y la CKM se estudiaron también en BMD y LGMD-R2. Las 3 proteínas se encontraron aumentadas en suero en las diferentes distrofias cuando se compararon con controles sanos (Figura 15). Además, las 3 proteínas mostraron una correlación positiva con los valores de capacidad vital forzada (FVC) (medida cuantitativa de debilidad respiratoria) en la cohorte de DMD pero no en la de BMD y LGMD-R2 (198). Otras proteínas relacionadas con la inflamación y la fibrosis diferencialmente expresadas en suero de pacientes con distrofias musculares en relación a controles sanos, son la MMP-9, la TIMP1, la TIMP2 o la osteopontina. Estas están elevadas en pacientes DMD y aumentan a medida que avanza la enfermedad aunque no correlacionan con las pruebas funcionales (210,211). La TSP-1 es una proteína involucrada en la inflamación que se encuentra elevada en sangre en pacientes con disferlinopatía no ambulantes comparado con pacientes con disferlinopatía ambulantes y controles sanos (82),(29).



**Figura 15. Concentraciones de sTnl, Myl3, CKM y FABP3 en suero de pacientes DMD, BMD, LGMD-2R y controles sanos. Las barras de línea y error representan la media y la desviación estándar de cada grupo. \*\*\* P <0,001; \*\*\*\* P <0,0001 (185).**

La leptina, proteína relacionada con el mecanismo adipogénico, está elevada en pacientes con DMD, pero no se ha podido asociar su concentración con las pruebas funcionales, cardíacas o pulmonares (199),(201). La proteína de transporte de ácidos grasos 3 (FABP3) en pacientes DMD, BMD y LGMD-R2 está aumentada en el suero

de los 3 grupos comparado con controles sanos. Además, en la cohorte de DMD, FABP3 correlaciona positivamente con los resultados de FVC (185).

La concentración del factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1) en suero de pacientes Pompe se encuentra significativamente reducido comparado con controles sanos y aumenta hasta valores normales una vez iniciado el tratamiento con ERT en los pacientes, pero no correlacionan con pruebas funcionales (202). Los tetrasacáridos (Glc4) están elevados en orina de pacientes con la enfermedad de Pompe. Los Glc4 son productos de la degradación amilolítica del glucógeno. Los Glc4 se producen mediante la degradación intravascular del glucógeno liberado por tejidos dañados y la actividad de enzimas pancreáticas. Los valores de los Glc4 están asociados a la respuesta clínica en aquellos pacientes tratados (203–205).

Se han estudiado varias proteínas como posibles biomarcadores pero no correlacionan con las distintas pruebas funcionales musculares. El hallazgo de biomarcadores en la circulación sanguínea que correlacionen con las distintas pruebas funcionales y con el estado del músculo sería de gran utilidad para poder evaluar el estado del paciente y la respuesta al tratamiento de forma sencilla.



## **2. HIPÓTESIS**



Las distrofias musculares por déficit de disferlina y de distrofina y la enfermedad de Pompe comparten una serie de mecanismos degenerativos comunes que permiten identificar biomarcadores sensibles a la evolución de los pacientes y plantear estrategias terapéuticas globales, que pueden tener particularidades específicas en función de la enfermedad a la que pretendan tratar.

En este sentido, la concentración sanguínea de factores de crecimiento relacionados con el proceso fibrótico y regenerativo del músculo pueden ser útiles en el seguimiento tanto de pacientes con distrofias musculares como con la enfermedad de Pompe.

Además, las terapias que pretenden contrarrestar el proceso degenerativo en la LGMD-R2 y la DMD deben centrarse en detener los procesos inflamatorios y fibróticos con el objetivo de preservar la estructura del músculo esquelético.



## **3. OBJETIVOS**



El objetivo principal de esta tesis es evaluar nuevas aproximaciones terapéuticas en la LGMD-R2 y la DMD y estudiar nuevos biomarcadores serológicos en distrofias musculares y enfermedad de Pompe.

Objetivos específicos:

1. Estudiar el posible efecto de inhibidores de proteasoma y del análogo de la vitamina D3 en pacientes LGMD-R2.
2. Estudiar las vías asociadas al PDGF-AA y al proceso fibrótico en pacientes DMD para poder aplicarlo a futuras terapias.
3. Encontrar biomarcadores diferencialmente expresados en pacientes con la enfermedad de Pompe en comparación con controles sanos.
4. Encontrar biomarcadores diferencialmente expresados en pacientes DMD, BMD y LGMD-R2 en comparación con controles sanos



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 4.1. Pacientes

---

Los resultados clínicos mostrados en esta tesis, así como las muestras de suero, plasma y biopsias musculares, han sido obtenidos en la Unidad de Enfermedades Neuromusculares del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) y en el Hospital de Sant Joan de Déu.

Los estudios funcionales hechos en pacientes se realizaron según la regulación española de ensayos clínicos y los estudios siguiendo las recomendaciones descritas en la Declaración de Helsinki. Los estudios realizados fueron aprobados por el Comité Ético del HSCSP. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado acorde con el estudio.

### 4.1.1. Pruebas de función muscular

La función muscular de los pacientes participantes en estos estudios fue evaluada por 3 fisioterapeutas expertas en el análisis de función muscular mediante las siguientes pruebas: 6MWT, tiempo/calificación andar 10 metros, tiempo/calificación subir y bajar 4 escalones, tiempo/calificación para levantarse del suelo. La habilidad funcional se analizó con escalas cuantitativas que incluyen la *Noth Star Ambulatory Assessment* (NSAA) y la escala funcional motora 20 (MFM-20). La MFM-20 se analizó basándose en 3 componentes: D1 (levantado), D2 (axial y proximal) y D3 (distal).

La fuerza muscular se estudió usando la calificación del *Muscle Research Council* (MRC) y con dinamometría de mano. La calificación del MRC se calculó con la suma de los valores individuales para los siguientes movimientos: flexión del hombro, abducción del hombro, flexión del codo, flexión del codo usando el músculo braquiorradial, extensión del codo, extensión de la muñeca, flexión de la muñeca, aducción de la cadera, abducción de la cadera, flexión de cadera, extensión de cadera, extensión de rodilla, flexión de rodilla, eversión del pie, inversión del pie, flexión plantar de pie y flexión dorsal del pie. Para medir el estado de salud del

paciente se usaron escalas completadas por los pacientes de actividades de la vida diaria diarias (escala ACTIVILIM), y escalas de calidad de vida: el cuestionario neuromuscular individualizado de calidad de vida (INQoL) y el cuestionario *short-form 36* (SF-36) (206). La función respiratoria se midió con una espirometría que medía capacidad vital forzada mientras el paciente estaba sentado (FVCs) y cuando estaba acostado en decúbito supino (FVCI), el volumen espiratorio forzado (FEV1) mientras el paciente está sentado, los valores de presión inspiratoria máxima (MIP) y la presión espiratoria máxima (MEP). Las pruebas se realizaon con espirómetro Carefusion Microlab ML 3500 MK8 spirometer (Carefusion, Yorba Linda, CA, USA).

#### **4.1.2. Imagen muscular**

Todos los pacientes fueron examinados mediante resonancia magnética en un Philips Achieva XR 1.5 Teslas ubicado en HSCSP. Se utilizó el mismo protocolo de posicionamiento para todos los pacientes: posición supina con las piernas estiradas, la rótula hacia arriba y los tobillos en una posición neutral. Se obtuvieron imágenes 2 punto Dixon con los siguientes parámetros de adquisición: TR / TE = 5,78 / 1,8, 4 ms, ángulo de giro = 15 °, FOV = 520 x 340 x 300 mm, tamaño de vóxel = 1 x 1 x 3 mm. El análisis de las imágenes Dixon MR de 3 puntos se realizó con PRIDE (Philips Research Image Development Environment). Las regiones de interés (ROI) se extrajeron manualmente en cinco cortes de los siguientes músculos: recto femoral, vasto intermedio, vasto lateral, vasto medio, aductor mayor, sartorio, gracilis, semitendinoso y semimembranoso, y en tres cortes de bíceps femoral, cabeza larga, bíceps femoral, cabeza corta y aductor largo.

## 4.2. Estudios *in vitro*

---

### 4.2.1. Cultivos primarios humanos y de líneas celulares

Para obtener fibroblastos a partir de biopsias humanas de músculo, la grasa y los capilares se eliminaron en medio *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (Lonza, Basel, Switzerland). Los explantes musculares fueron cultivados para la obtención de mioblastos y fibroblastos (207). Una vez los diferentes tipos celulares empezaron a migrar desde el explante, se hizo una separación inmunomagnética mediante anticuerpos específicos anti-CD56 (MiltenyiBiotec, Bergisch-Gladbach, Germany). La fracción positiva corresponde a mioblastos y la negativa a fibroblastos. La fracción negativa (CD56-) se cultivó en medio de proliferación *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) y medio 199 (M199) (3:1) (Lonza), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Lonza), 10 mM glutamina (Lonza) y penicilina-estreptomicina (Lonza) y se comprobó su pureza con el marcador de fibroblastos TE-7 (Merck; Billerica, MA, USA) mediante inmunofluorescencia (IF).

Los mioblastos obtenidos de un paciente con una mutación *missense* en homocigosis (c.4882G>A) en el gen *disferlina* y de un paciente sano fueron inmortalizados por el Dr. Mouly (208). Estas células se expandieron en un medio específico de músculo esquelético (SMM; Promocell, Heidelberg, Germany). Una vez los mioblastos llegaron a confluencia, el medio se cambió a medio de diferenciación (DMEM:M199 (3:1) (Lonza), suplementado con 2% FBS (Lonza), 10 µg/ml insulina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 10mM glutamina (Lonza) y penicilina-streptomicina (Lonza) durante 7-9 días para inducir la diferenciación a miotubos.

## 4.2.2. Tratamiento con inhibidores proteasoma y EB1089

Los miotubos ya diferenciados se trataron con vitamina D3 o EB1089 (Sigma Aldrich) a 100nM, ixazomib (Selleckchem, Munich, Germany) (25nM, 50nM y 100nM) y oprozomib (ONX 0912) (Selleckchem) (10nM, 50nM y 100nM). El tratamiento de ixazomib y oprozomib se combinó con EB1089 a 8 y 24 horas respectivamente.

### 4.2.2.1. Ensayo reparación

Los mioblastos inmortalizados se cultivaron en placas compartimentadas hasta llegar a confluencia para después ser diferenciados a miotubos. Este ensayo se llevó a cabo con el químico dodecilsulfato sódico (SDS) (209). El SDS es un surfactante aniónico que produce un daño en la membrana celular causando la liberación de componentes intracelulares (210). El daño en la membrana se indujo mediante el uso del SDS como se describe a continuación: los miotubos se limpiaron con HBSS (Lonza) para después añadir la solución de daño (HBSS con 0.25mM SDS (Sigma-Aldrich)) durante 2 minutos. Pasados estos 2 minutos, se lavaron las células con HBSS y se incubaron en medio de proliferación durante 90 segundos y 10 minutos, para inducir la reparación de membrana. Tanto el daño como la reparación de membrana se realizaron a 37°C. Las células con membrana dañada sin capacidad de reparación se identificaron por exposición al ioduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich) (20 µg/mL en HBSS). Si la membrana no está reparada, el IP entra en las células y penetra en el núcleo intercalándose en el ADN emitiendo fluorescencia. Después de 2 minutos de exposición al colorante, las células se lavaron en HBSS y se fijaron en 4% de paraformaldehído (PFA) en PBS para después teñir los núcleos con Hoescht 33342 (Invitrogen, Waltham, MA, EEUU). En cada condición, se contó el número total de núcleos y los núcleos IP positivos usando el programa Fiji (211). La representación gráfica se realizó utilizando los valores de la ratio núcleos IP positivos/núcleos totales.

### 4.2.3. Tratamiento PDGF-AA e inhibidores vía RhoA

Los fibroblastos procedentes de 3 pacientes con DMD se cultivaron hasta obtener una confluencia del 80% aproximadamente en medio de proliferación con 10% de FBS para luego cambiar éste a un medio basal al 0.5% FBS (DMEM:M199 (3:1) (Lonza), suplementado con 0.5% de FBS (Lonza), 10 mM glutamina (Lonza) y penicilina-estreptomicina (Lonza) durante 24 horas. Este cambio se hizo para que el FBS no interfiriese en los resultados obtenidos con el PDGF-AA. Según si el experimento era para testar la activación de la vía o para ver un efecto funcional, los tiempos de inducción/inhibición fueron distintos. Para testar la activación de la vía de RhoA con PDGF-AA, primero se inhibió la vía con Fasudil 50µM (Bio-Techne, Minnesota, USA) o C3-exoenzyme 2µg/ml (Cytoskeleton, Denver, USA) durante 15 horas para después activar la vía con PDGF-AA a 50ng/ml durante 20 minutos y proceder al ensayo de G-LISA o de inmunofluorescencia de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (p-MLC). Para testar el efecto funcional de la vía de PDGF-AA y de la inhibición de esta, se inició el tratamiento de C3-exoenzyme a 2µg/ml o Fasudil a 50µM para inhibir la vía de RhoA y 4 horas más tarde se añadió el PDGF-AA a 50 ng/ml. Este ciclo de inhibición/inducción se repitió tantos días como durase el ensayo. Se hicieron 4 condiciones diferentes: fibroblastos sin tratar, tratados con c3-exoenzyme y PDGF-AA, con Fasudil y PDGF-AA y con PDGF-AA solo.

#### 4.2.3.1. Ensayo proliferación celular

El ensayo de proliferación se hizo a 2 tiempos; 48 y 72 horas. Se utilizaron placas de 96 pocillos, se cultivaron 5000 fibroblastos por pocillo y se hicieron 3 réplicas por cada condición. Como el ensayo duró un total de 72 horas, se realizaron 3 ciclos de inhibición/inducción. El ensayo de bromodeoxiuridina (BrdU) se basa en la incorporación de éste en el ADN sintetizado de nuevo en las células en división (durante la fase S del ciclo celular) mediante la substitución de los residuos de

timidina. El BrdU se añadió 24h antes de empezar el ensayo. Tras eliminar el sobrenadante, las células se fijaron y el ADN se desnaturalizó en un mismo paso para después añadir el anticuerpo anti-BrdU. Después de varios lavados con PBS, se añadió la solución substrato siguiendo las indicaciones del fabricante (Roche, Indianapolis, IN). El resultado se midió usando el lector de placas Coulter AD 340 (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) con el programa AD-LD.

#### **4.2.3.2. Ensayo migración celular**

El ensayo de migración se realizó a 24 y 72 horas con 3 réplicas por cada condición. El ensayo duró un total de 72 horas, se realizaron 3 ciclos de inhibición/inducción. Se utilizaron placas de 24 pocillos con insertos (Ibidi, Munich, Germany) que separan 2 cámaras, donde se siembran o crecen las células. Se sembraron 15,000 células en cada parte del inserto y después de 24 horas en medio basal al 0.5% FBS se trataron con 25 µg/ml de mitomicina C (Sigma) durante 1 hora. La mitomicina C es un antibiótico antitumoral que inhibe la síntesis del ADN. Este agente se usa en ensayos de migración para que el resultado sea debido a la propia migración celular y no a la proliferación. Tras la hora de incubación con la mitomicina C, se quitó el inserto dejando un espacio de 500 µm entre las 2 cámaras y se procedió a los ciclos de inhibición/inducción de la vía de RhoA. A las 48 y 72 horas se fijaron las células en PFA 4% y se tiñeron con Hoescht 33342 (Invitrogen). Se hicieron 3 imágenes a 10X de cada pocillo y la cuantificación de las células que habían migrado al espacio de 500 µm se cuantificó con el programa Fiji.

#### **4.2.3.3. Cuantificación de colágeno *in vitro***

El colágeno total soluble liberado por los fibroblastos en cultivo se cuantificó usando un ensayo colorimétrico. 24 horas antes de empezar el ensayo se cambió el medio a medio basal al 0.5% FBS y se realizó un ensayo de 4 días, con 4 ciclos de inhibición/inducción. Se utilizaron placas de 24 pocillos y se sembraron 10,000

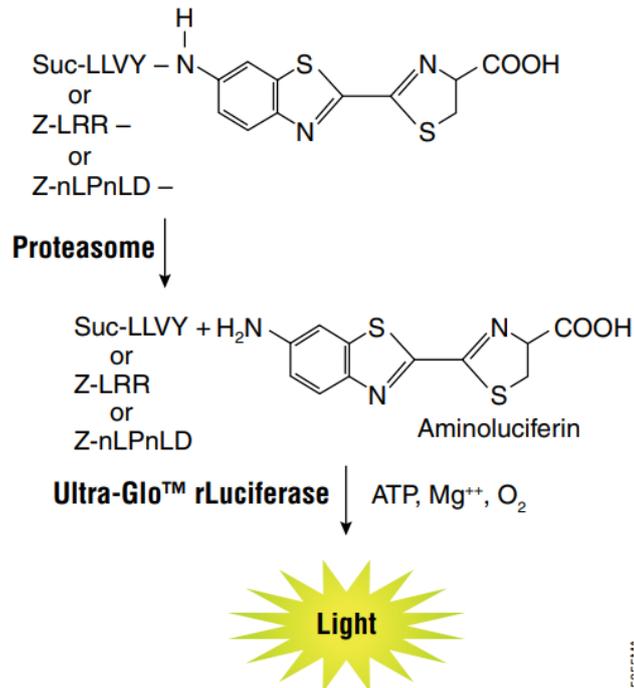
células/cm<sup>2</sup>. El ensayo se realizó con el kit comercial Sircol, que cuantifica la tasa de colágeno soluble sintetizado. El sobrenadante se recogió en tubos por cada pocillo cultivado y se añadió 100µl del reactivo de concentración para incubar durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugaron las muestras, se añadió 1ml del reactivo Sircol y se dejó en un agitador mecánico durante 30 minutos para después centrifugar y añadir 750 µl de una solución de lavado (Biocolor, UK). Finalmente, se volvió a centrifugar y se resuspendió la muestra en 250 µl de un reactivo alcalino. Las muestras se pasaron a una placa de 96 pocillos para seguidamente leer el resultado de cada muestra a 555nm usando el lector de placas Coulter AD 340 (Beckman-Coulter) con el programa AD-LD. Para eliminar resultados debidos al aumento de proliferación de las células, una vez terminado el ensayo, se tiñeron los núcleos con TO-PRO-3 (ThermoFischer) y se midió la señal emitida con el lector infrarrojo Odyssey (Li-cor, Lincoln, Nebraska, USA). Los resultados obtenidos con el ensayo Sircol se normalizaron en relación a la señal emitida por TO-PRO-3.

## **4.3. Biología molecular**

---

### **4.3.1. Ensayo de la luciferasa con inhibidores del proteasoma**

Las células se cultivaron en placas negras de 96 pocillos (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) a una concentración de 5000 células/pocillo y se hicieron 3 réplicas por condición. Cuando llegaron a confluencia, se cambió a medio de diferenciación y se usaron los tratamientos correspondientes en los tiempos indicados. Las actividades CT-L, C-L y T-L se analizaron por quimioluminiscencia. Los sustratos de cada tipo de proteasa están unidos al sustrato de la luciferasa (aminoluciferin) y cuando la subunidad 20S del proteasoma reconoce el sustrato de CT-L, C-L o T-L actúa produciendo un corte y liberando la aminoluciferina, la cual mediante la luciferasa produce luz. (Figura 16).



**Figura 16. Ensayo luciferasa con inhibidores del proteasoma.** Los substratos luminogénicos (Suc-LLVY, Z-LRR o Z-nLPnDL pertenecen a cada subunidad del proteasoma y una vez reconocidos por la subunidad 20S del proteasoma, éste produce un corte catalítico liberando la aminoluciferina (substrato de la luciferasa) y produciendo luz.

Para realizar el ensayo se mezclaron los tampones contenidos en el kit con la luciferina y el substrato apropiado en cada caso y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se añadió 50µl por pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos siguiendo las indicaciones del ensayo Proteasome-Glo™ 3-substrate System (Promega, Madison, WI, USA). Los resultados fueron obtenidos a través del lector Victor 3v Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

#### 4.3.2. Activación RhoA-GTP mediante PDGF-AA

Para comprobar si el PDGF-AA activaba la vía de RhoA en fibroblastos de DMD se analizó la proteína RhoA-GTP mediante un ensayo colorimétrico. Se sembraron células a un 80% de confluencia y se hizo un cambio a medio basal 0.5% FBS durante 24 horas. Se procedió a la inhibición de la vía con el inhibidor C3-exoenzyme a

concentración 2µg/ml durante toda la noche. Al día siguiente, se activó la vía con PDGF-AA a 50ng/ml durante 20 minutos a 37°C para después proceder con el ensayo G-LISA (Cytoskeleton, Denver, CO, USA). El ensayo de G-LISA se utiliza para medir la activación de proteínas RhoA, ya que su activación depende de la unión a GTP. El kit contiene una proteína de unión a RhoA-GTP acoplada a los pocillos de la placa, permitiendo que las proteínas RhoA-GTP extraídas de lisados celulares se puedan unir a los pocillos, mientras que las proteínas RhoA-GDP (inactivas) serán retiradas tras los lavados. La unión de RhoA-GTP se detecta mediante un anticuerpo anti-RhoA. Para calcular la cantidad de RhoA-GTP se midió la cantidad de RhoA total mediante la expresión por WB. El cálculo de RhoA-GTP se hizo en relación a la cantidad de RhoA total.

### **4.3.3. Contenido actina filamentosa**

Para el análisis del contenido de actina filamentosa (F-actina) en fibroblastos en cultivo, se realizaron 4 condiciones experimentales: no tratados, inhibidos con C3-exoenzyme o Fasudil 50µM durante toda la noche y después activados con PDGF-AA durante 20 minutos a 37°C o solamente activados con PDGF-AA. Después de este tiempo se fijaron las células con PFA 4% y se incubaron con Rhodamine Phalloidin Reagent (Abcam, Cambridge, UK) durante 1 hora para después teñir con Hoescht 33342 (Invitrogen).

## **4.4. Western-Blot (WB)**

---

Las células correspondientes a cada condición se lisaron en tampón RIPA (Sigma-Aldrich) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche, Basel, Switzerland). Los lisados celulares se centrifugaron a 4°C a 13000xg durante 20 minutos y se guardaron los sobrenadantes a -80°C. La concentración proteica se cuantificó usando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). 30 µg de proteína total se cargó en un gel de 10% de poliacrilamida y se transfirió a una

membrana de nitrocelulosa. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon durante 1 hora en caseína diluida en 1:1 con solución salina tamponada con Tris (TBS). Las membranas se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente a cada condición experimental. Los anticuerpos secundarios correspondientes unidos al Dye680 o Dye800 (Li-Cor) se incubaron durante una hora a dilución 1:7500. Las bandas específicas correspondientes a las proteínas de interés se visualizaron con el sistema de detección infrarroja Odyssey (Li-Cor) y con el programa Image Studio (Li-Cor). Como control de carga se utilizaron las bandas específicas de desmina (Novocastra, Newcastle, UK) o se midieron las bandas de proteína totales de proteínas con el kit Revert 700 (Li-Cor).

## **4.5. Análisis proteómico**

---

La extracción proteica, digestión, análisis y procesamiento de datos se realizaron en el servicio de proteómica de IDIBELL.

### **4.5.1. Extracción y digestión proteica**

La extracción proteica de fibroblastos procedentes de pacientes DMD tratados con PDGF-AA y sin tratar se realizó con urea 6M/200mM bicarbonato de amonio. Los extractos proteicos se cuantificaron mediante RDC Protein Assay kit (Biorad, #5000-120). La digestión se realizó usando Lys-C (WAKO, #125-05061) y tripsina Promega, #V5280). Se eliminaron las sales de la mezcla de péptidos mediante el uso de columnas comerciales columns Ultra Microspin C18, 300A silica (The Nest Group, #SUM SS18V).

### **4.5.2. Cromatografía líquida – espectrometría de masas**

Las mezclas de péptidos se analizaron utilizando un espectrómetro de masas (Lumos Orbitrap) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) acoplado al cromatógrafo

liquido EASY-nLC 1000 1000 (Thermo Fisher Scientific (Proxeon), Odense, Denmark). Las muestras se cargaron directamente en la columna analítica y se separaron por cromatografía de base inversa. Todos los datos se adquirieron con el programa Xcalibur v3.063.

#### **4.5.3. Procesamiento de datos**

Las proteínas se identificaron utilizando el programa MaxQuant (versión 1.6.1.0) mediante la búsqueda en la base de datos Swissprot. Se escogió la tripsina como enzima y la carbamidometilación (C) como modificación fija. La oxidación y acetilación se utilizaron como modificaciones variables. Las búsquedas se realizaron usando una tolerancia de péptidos de 10 ppm y de iones de 0.5Da. Los valores de intensidad se normalizaron utilizando el algoritmo LFQ.

#### **4.5.4. Análisis bioinformático**

El listado final de proteínas se analizó mediante R. Primero se eliminaron los péptidos/proteínas identificados como potencialmente contaminantes y todos aquellos que eran inversos (identificado significativamente en la base de datos inversa). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante una prueba t. Los valores de p se ajustaron utilizando el procedimiento Benjamini-Hochberg.

### **4.6. ELISA**

---

Los sobrenadantes de los cultivos de miotubos se concentraron con columnas Amicon de 100kb (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) mientras que las muestras de suero se obtuvieron centrifugando la sangre a  $1600 \times g$  9 minutos.

En ambos casos se guardaron las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta proceder a su uso. Las concentraciones de proteínas se determinaron usando ELISAs específicos siguiendo las instrucciones del fabricante; human TSP-1, PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1 (R&D, Minneapolis, MN, USA), PDGF-AA (Thermo Fisher Scientific, Nepean, Canada) y CTGF (EIAAB

Science Co, Wuhan, China). Las muestras se midieron en duplicado y se usó en un lector Coulter AD 340 (Beckman-Coulter) con el programa AD-LD.

## **4.7. Inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IH)**

---

La IF de p-MLC y TE-7 se realizó a partir de células en cultivo crecidas en cubreobjetos con gelatina 0.15%. Éstas se fijaron con etanol durante 5 minutos, después de los lavados con TBS, se añadió bloqueo universal (Ultracruz Blocking Reagent, Santa Cruz Biotechnology). La incubación con el anticuerpo primario de conejo anti-fosfo-MLC (Cell Signalling, Leiden, The Netherlands) o TE-7 (Merck) se realizó a temperatura ambiente durante 1h, y tras los lavados con TBS, se incubó con el anticuerpo secundarios anti-conejo Alexa 488 (Invitrogen) en el caso de la IF de p-MLC o con el anti-ratón Alexa 488 (Invitrogen) en el caso de la IF de TE-7 junto a la tinción de núcleos con Hoescht 33342 (Invitrogen). Las imágenes se obtuvieron con el microscopio Olympus BX51 acoplado a una cámara DP72 Olympus (Olympus, City, country). El resultado del cálculo de señal de las IF de p-MLC se obtuvo midiendo la intensidad de fluorescencia de las células individuales usando programa Fiji (211).

La IH de PDGF-AA se realizó a partir de músculo parafinado. Brevemente, las muestras de desparafinaron (xilol, etanol absoluto, etanol 95° y etanol 70°), se pusieron en agua destilada y se pretrataron con citrato 10 mM (pH 6) a 100°C. Después de este paso se lavaron en PBS y se incubaron en solución de bloqueo (albumina se suero bovino 4%) para seguidamente incubar con el anticuerpo anti-PDGF-AA (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras 3 lavados se incubó con anticuerpo anti-conejo biotinilado (Vector Laboratory Inc. Burlingame, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente para después revelar con complejo avidina-biotina peroxidasa (Dako, Glostrup, Denmark). Finalmente se sumergieron los cortes en hematoxilina de Mayer durante 10 segundos,

luego se lavó bajo agua corriente y se montó en medio de montaje acuoso, Aquatex (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

## 4.8. Estadística

---

El análisis de resultados del tratamiento con inhibidores de proteasoma se analizó usando la comparación one-way ANOVA seguida de un test *post-hoc*.

El análisis de biomarcadores en pacientes con distrofias musculares y enfermedad de Pompe se hizo mediante pruebas no paramétricas. La prueba U de Mann-Whitney se utilizó para comprobar si existían diferencias significativas en la concentración de biomarcadores entre los distintos grupos analizados. La prueba no paramétrica de Spearman se utilizó para analizar las correlaciones entre concentración de factores de crecimiento y resultados de función muscular, espirometría, escalas de calidad de vida del paciente y resultados de la fracción grasa. Para eliminar errores de las múltiples correlaciones, se utilizó el test de Bonferroni. Finalmente, se realizó una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para estudiar si el PDGF-BB era capaz de diferenciar entre grupos de pacientes sintomáticos y asintomáticos. Todos los análisis se realizaron mediante el programa estadístico IBM SPSS® Statistics 21 y se consideraron significativos si la *p* era menor de 0.05. Los gráficos resultantes del análisis se hicieron mediante el programa GraphPad Prism 5.0 (LaJolla, CA, USA).



# 5. RESULTADOS



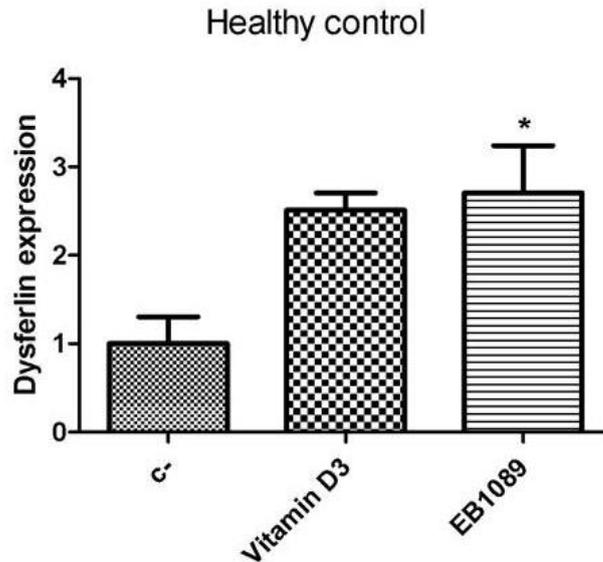
## **5.1. Aproximaciones terapéuticas en un modelo celular de disferlinopatía**

---

Debido a que no existe un tratamiento efectivo para la LGMD-R2, quisimos testar el efecto de la inhibición del proteasoma en la expresión de disferlina, ya que estudios previos habían demostrado resultados positivos en distrofinopatías (212),(153). Utilizamos el oprozomib e ixazomib, dos inhibidores del proteasoma de nueva generación que presentan una menor toxicidad y elevada efectividad. Además, estudiamos si la combinación con un análogo de la vitamina D3 (EB1089) promovía también un aumento de disferlina. El EB1089 tiene un efecto mucho más potente que la vitamina D3 (213) pero no se ha testado su efecto en la expresión de disferlina.

### **5.1.1. Tratamiento de Vitamina D3 y EB1089**

El primer objetivo consistió en comprobar que el análogo de vitamina D (EB1089) promovía un aumento de expresión de disferlina mayor que el producido por la vitamina D3. Para ello se utilizaron miotubos procedentes de controles sanos y se trataron con 100nM de Vitamina D3 o EB1089 durante 24h. Ambos fármacos provocaron un aumento de expresión de disferlina, pero el tratamiento con EB1089 mostró diferencias significativas respecto a los miotubos no tratados (Figura 17). Por este motivo, decidimos usar EB1089 en combinación con inhibidores del proteasoma para aumentar la expresión de disferlina.



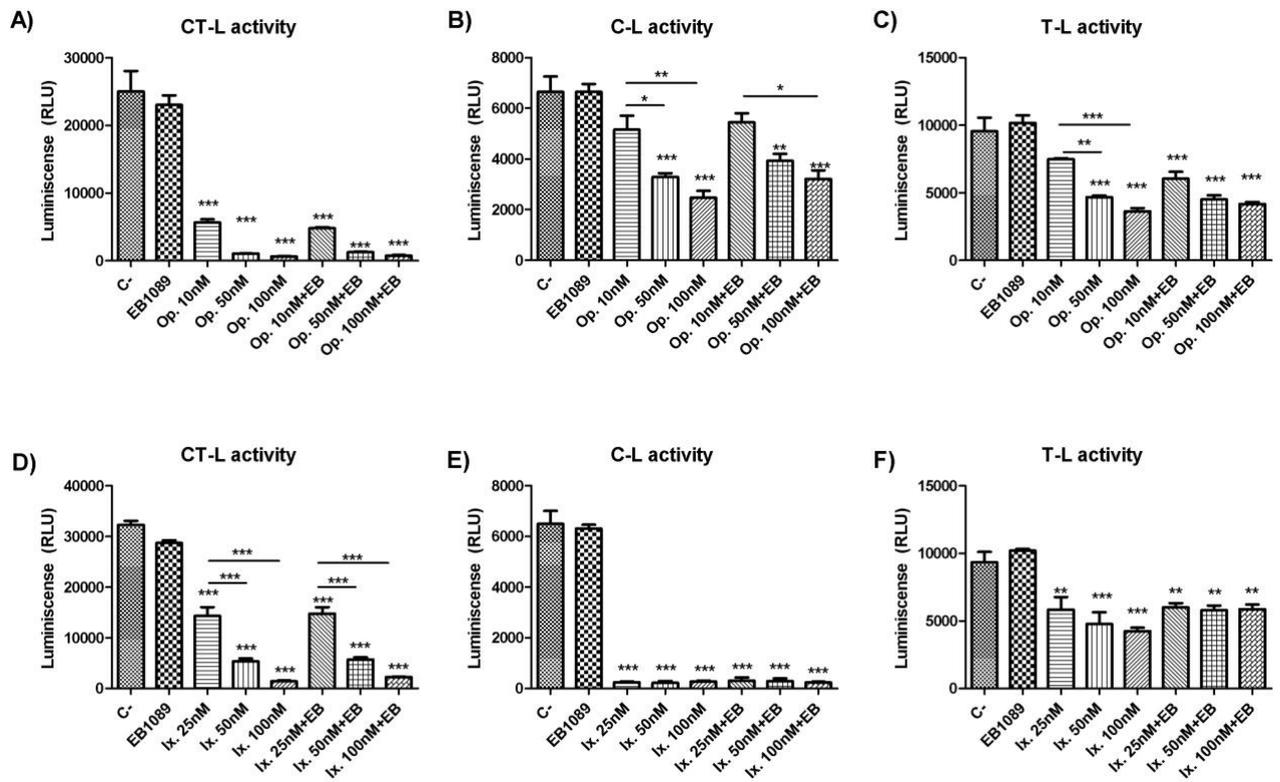
**Figura 17. Efecto de la vitamina D3 y EB1089 en miotubos derivados de un control sano.** Cuantificación de bandas de WB de miotubos no tratados (C-), tratados con vitamina D3 o tratados con EB1089 durante 24 h. Los datos se representan como la media de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando one-way Anova seguido de la prueba post hoc de Tukey. La significación estadística se estableció mediante \* $p < 0,05$ .

### 5.1.2. Inhibición del proteasoma

Seguidamente analizamos a qué tiempo los inhibidores de proteasoma, ixazomib y oprozomib, producían el mayor aumento de la expresión de disferlina en los miotubos procedentes de un paciente con LGMD-R2 (disf -/-). Observamos que ixazomib tuvo un efecto mayor a las 8 horas y oprozomib después de 24h.

Para comprobar que los inhibidores estaban actuando en miotubos, se llevó a cabo la cuantificación de la actividad quimiotripsina (CT-L), tripsina (T-L) y caspasa (CT-L) a partir de miotubos tratados con oprozomib, ixazomib y EB1089. Los resultados de la actividad del proteasoma mostraron que el tratamiento de los miotubos disf -/- con 10 nM de oprozomib durante 24h tenía una alta selectividad hacia el sitio activo del proteasoma CT-L. Sin embargo, a dosis más altas (50 nM y 100 nM), oprozomib también inhibía significativamente la actividad C-L y T-L (figura 18A-C). El tratamiento con ixazomib inhibió las 3 subunidades de proteasoma (figura 18D-F). Al añadir EB1089 al cultivo de miotubos, no se inhibió ninguna subunidad del proteasoma. Al

combinar EB1089 con ixazomib o oprozomib, no se observó ningún efecto en la inhibición de ninguna de las subunidades del proteasoma.

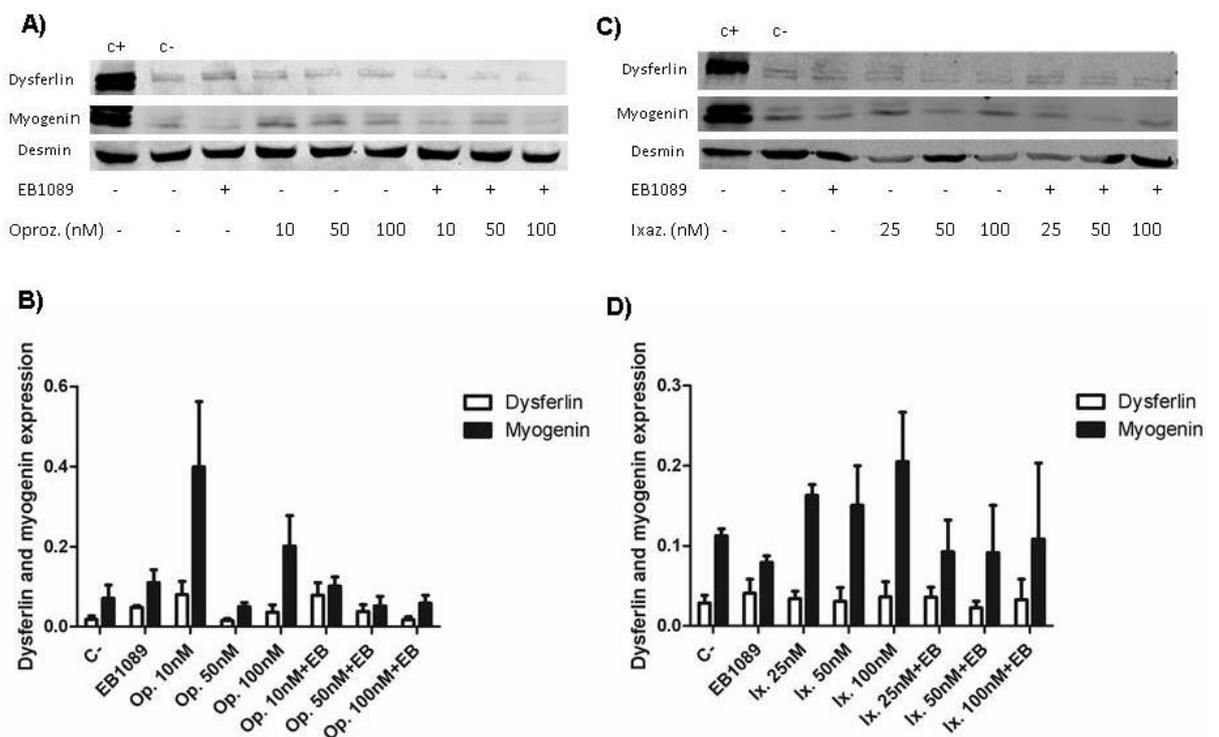


**Figura 18. Perfil de inhibición de proteasoma.** Las tres actividades del proteasoma se analizaron mediante un método basado en quimioluminiscencia. Los miotubos disf -/- se pre-trataron con oprozomib y EB1089 durante 24 h. El tratamiento con oprozomib presentó inhibición en: A) CT-L en todas las concentraciones probadas. B) C-L y C) T-L a dosis altas (50 nM y 100 nM). También se analizó el pre-tratamiento con ixazomib y EB1089 durante 8h y se inhibió la actividad de: D) CT-L, E) C-L y F) T-L en todas las dosis probadas con diferencias significativas. CT-L: actividad quimi tripsina, C-L: actividad caspasa, T-L: actividad tripsina. Los datos se representan como la media de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando one-way ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. La significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 5.1.3. Expresión de disferlina y miogenina

El siguiente objetivo consistió en analizar la expresión de disferlina y miogenina en miotubos *disf*<sup>-/-</sup> tratados con EB1089, oprozomib e ixazomib. Los tratamientos con 10 nM de oprozomib y con la combinación de oprozomib y EB1089 aumentaron la expresión de disferlina y miogenina (figura 19A-B), aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Por otra parte, el tratamiento con ixazomib (figura 19C-D) no mostró un aumento significativo en la expresión de disferlina. Aunque los niveles de miogenina aumentaron después del tratamiento con ixazomib, los resultados no alcanzaron significación estadística.

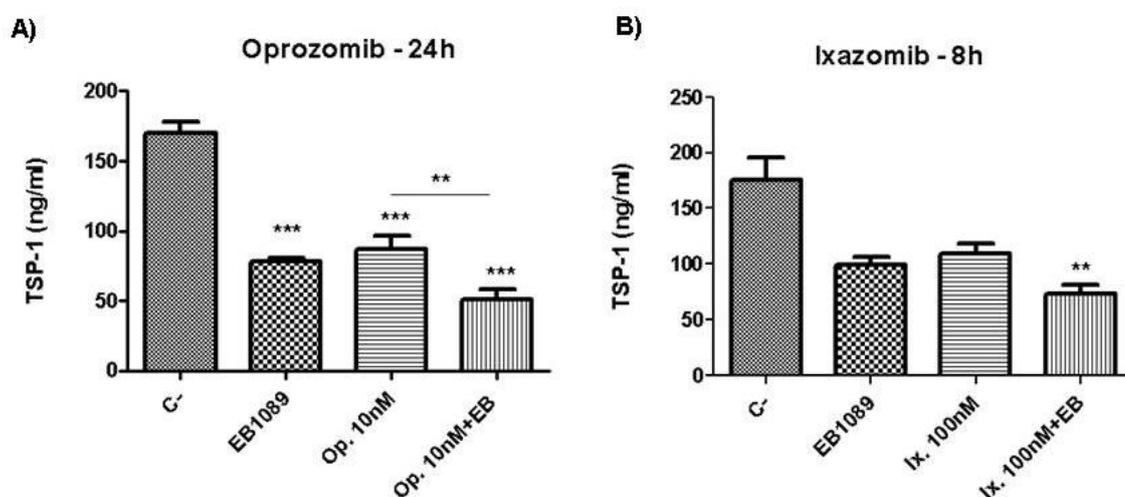


**Figura 19. Expresión de disferlina y miogenina en células musculares *disf*<sup>-/-</sup>.** A) WB representativo de miogenina y disferlina con el tratamiento con oprozomib y EB1089. C +: miotubos derivados de controles no tratados, (C-) mitubos *disf*<sup>-/-</sup> no tratados. B) Cuantificación de bandas de WB de expresión de disferlina o miogenina con oprozomib y EB1089. C) WB representativo de miogenina y disferlina con ixazomib y EB1089. D) Cuantificación de bandas de WB de expresión de disferlina o miogenina con ixazomib y EB1089. Los datos están representados como la media de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando one-way ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. La significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

### 5.1.4. Expresión de TSP-1

Los miotubos procedentes de pacientes con LGMD-R2 producen una mayor secreción de TSP-1 que los controles. Por este motivo evaluamos la secreción de TSP-1 por los miotubos *disf -/-* tratados con EB1089, oprozomib e ixazomib. El tratamiento con EB1089 produjo una reducción significativa de la liberación de TSP-1 a las 8h. Los niveles de TSP-1 también disminuyeron significativamente con el tratamiento de oprozomib y EB1089 (figura 20A) y se redujeron aún más cuando las células se trataron con la combinación de EB1089 y oprozomib.

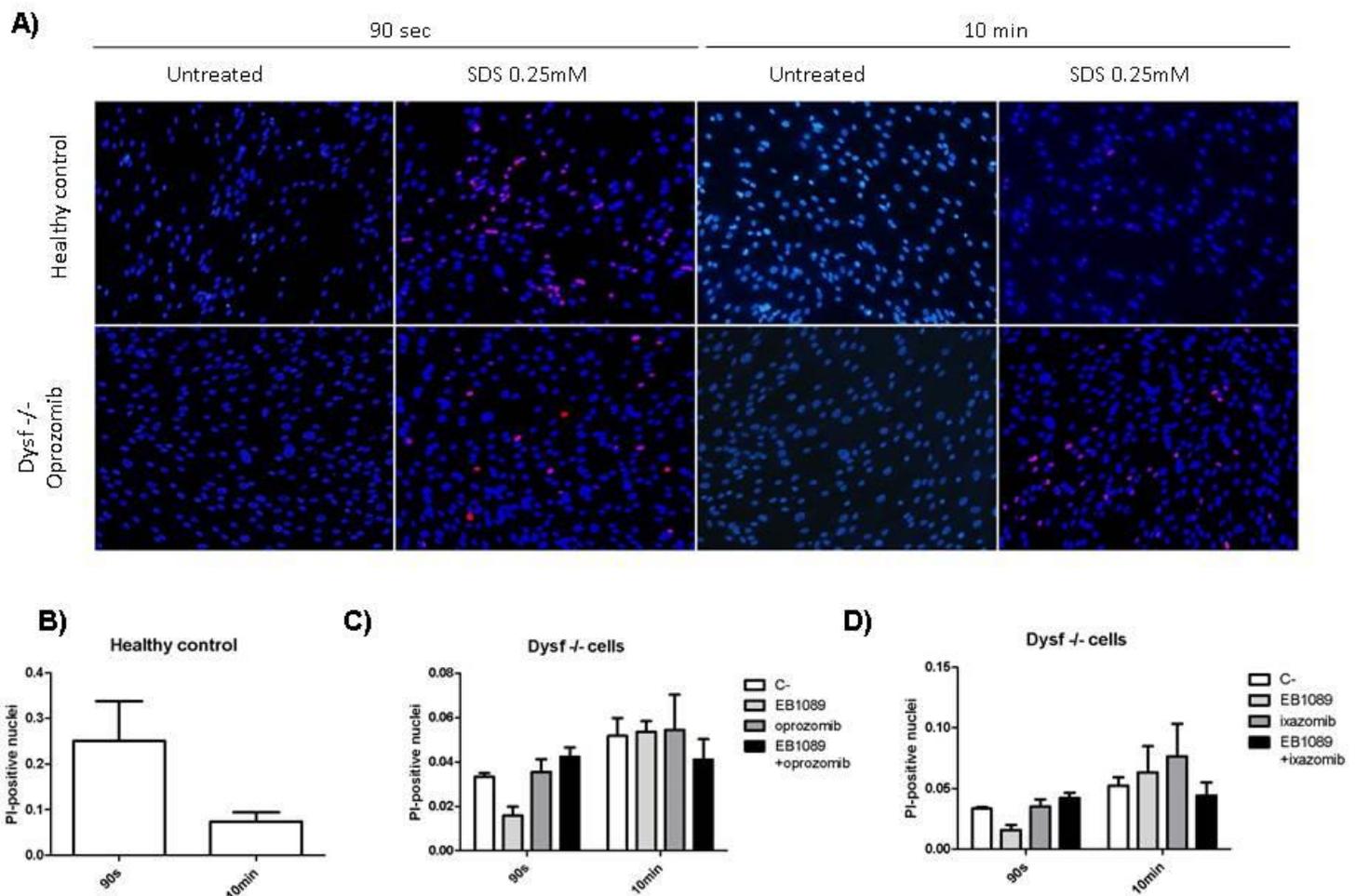
El tratamiento con ixazomib combinado con EB1089 produjo una disminución significativa de TSP-1 (figura 20B). Sin embargo, aunque EB1089 e ixazomib individualmente no produjeron cambios significativos en la expresión de TSP-1, se redujo en comparación con los miotubos no tratados.



**Figura 20. Expresión de TSP-1 por miotubos *disf -/-* tratados con oprozomib, ixazomib y EB1089.** A) Expresión de TSP-1 con tratamiento de oprozomib a 10nM y EB1089 100nM. B) Expresión de TSP-1 con tratamiento de ixazomib a 100nM y EB1089 100nM. Los datos se representan como la media de 5 repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando one-way ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. La significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 5.1.5. Ensayo reparación

La disferlina participa en la reparación de la membrana después de una lesión. Para ver si el ligero aumento de disferlina obtenido con los tratamientos era funcional, analizamos la capacidad de los miotubos *dysf*<sup>-/-</sup> para reparar el sarcolema después de una lesión. Los miotubos derivados de controles sanos repararon la membrana 10 minutos después de la lesión, mostrada por la expresión de PI (Fig. 21A-B). Sin embargo, los miotubos *dysf*<sup>-/-</sup> no presentaron ninguna reparación de sarcolema en ninguna de las condiciones analizadas (Fig. 21C-D).



**Figura 21. Reparación de membranas con tratamiento con oprozomib, ixazomib y EB1089.** A) Imágenes representativas de núcleos IP positivos después del tratamiento con SDS a los 90 segundos y a los 10 minutos. La primera fila corresponde a los miotubos sanos y la segunda fila a los miotubos *dysf*<sup>-/-</sup> tratados con oprozomib. B) Núcleos positivos para IP en miotubos de controles sanos a los 10 minutos. C) Miotubos *dysf*<sup>-/-</sup> no tratados, tratados con EB1089, oprozomib a 10nM y la combinación de oprozomib 10nM con EB1089 a las 24h. D) La cuantificación de núcleos positivos para IP en miotubos *dysf*<sup>-/-</sup> no

tratados, tratados con EB1089, ixazomib a 100nM y tratados con la combinación de ixazomib a 100nM con EB1089 a las 8h. Los datos se representan como la media de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando one-way ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Tukey. La significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

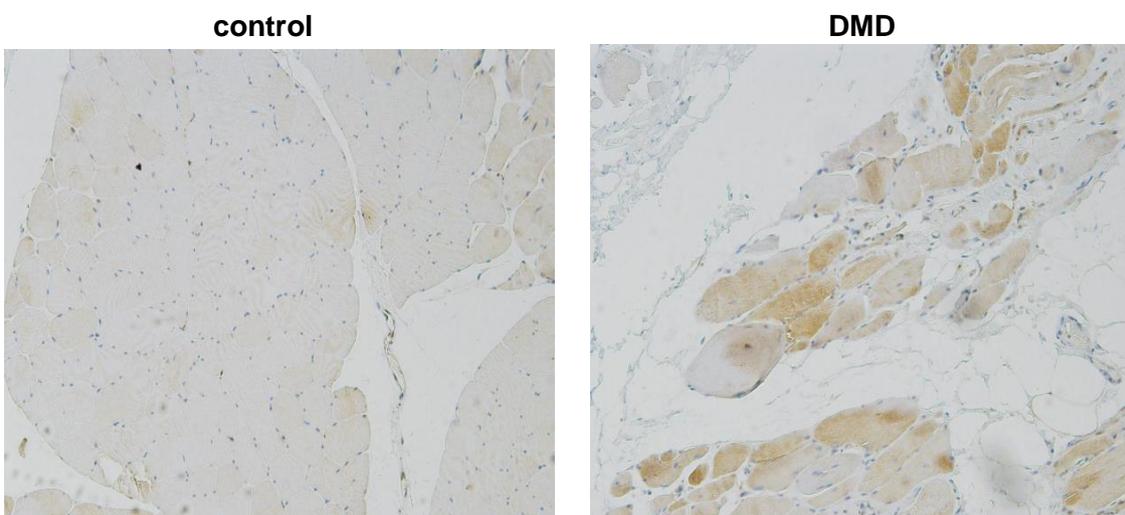
## 5.2. Vías moleculares y aproximaciones terapéuticas implicadas con la fibrosis y PDGF-AA

---

Aunque el proceso fibrótico ha sido muy estudiado en otras patologías como la hipertensión pulmonar o la fibrosis hepática, los mecanismos moleculares implicados en la fibrosis muscular no se conocen de forma completa. Por este motivo, nuestro objetivo principal fue estudiar las vías activadas por el PDGF-AA que tuvieran un papel importante en la fibrosis en pacientes DMD ya que el conocimiento de estas vías podría ayudar a encontrar nuevas dianas terapéuticas.

### 5.2.1. Expresión de PDGF-AA en músculo DMD y control

El primer objetivo consistió en confirmar los resultados previamente publicados sobre la existencia de una expresión incrementada de PDGF-AA en fibras musculares en pacientes con DMD en comparación con controles sanos (108). Para ellos realizamos

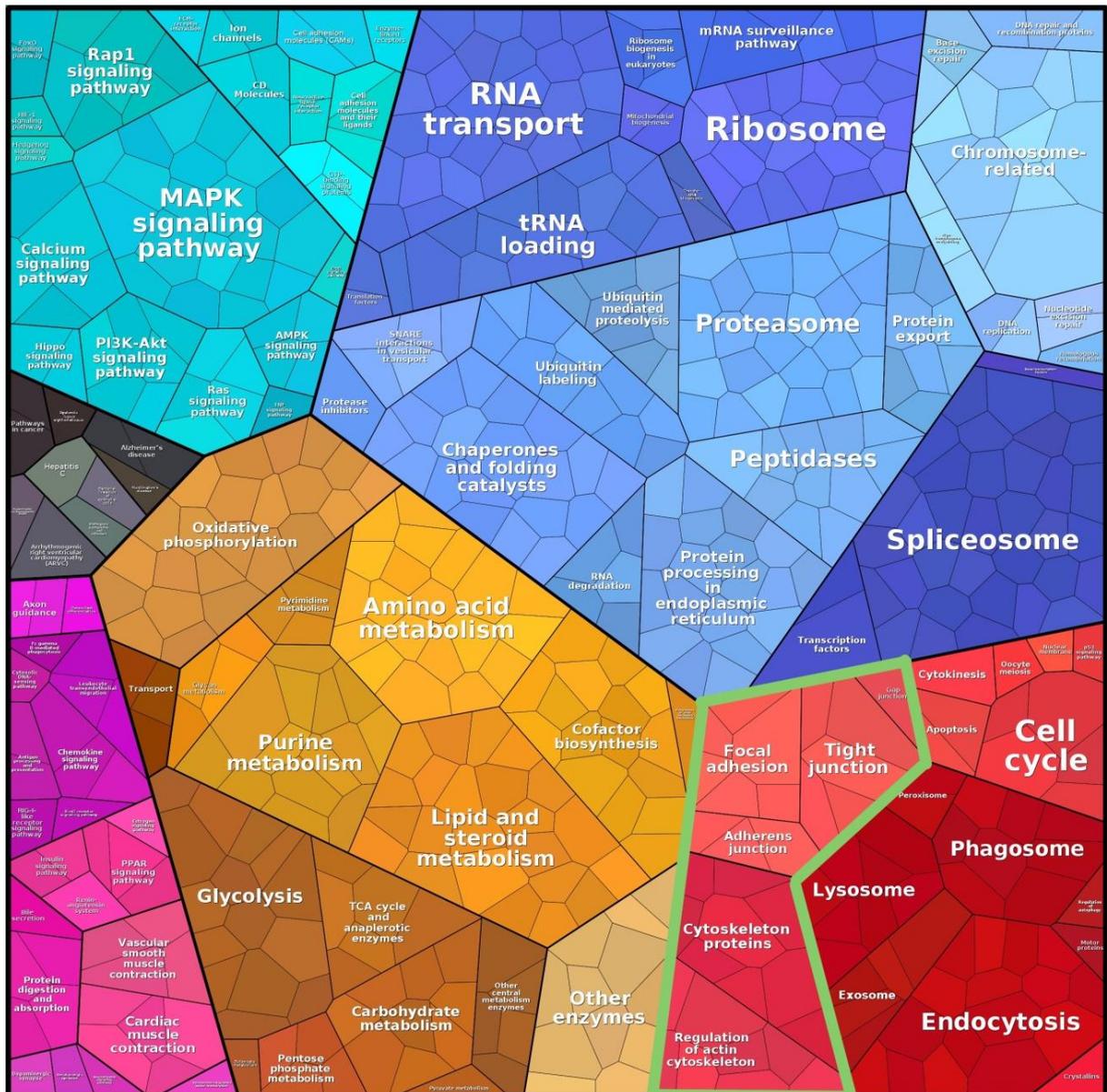


**Figura 22. IH de PDGF-AA en músculo.** IH procedente de músculo esquelético en pacientes DMD (n=2) y en controles sanos (n=2) a partir de muestras parafinadas.

una tinción de IH en biopsias musculares de pacientes DMD (n=2) y en controles (n=2) y observamos que en los pacientes DMD las fibras musculares expresaban PDGF-AA, mientras que en los controles la expresión estaba limitada a los capilares situados en el espacio intersticial (figura 22).

### **5.2.2. Proteómica fibroblastos tratados con PDGF-AA**

Dado que existía un incremento en la expresión de PDGF-AA en las fibras musculares de los pacientes con DMD, quisimos estudiar qué vías intracelulares se veían activadas por dicha molécula en fibroblastos residentes en el estroma muscular en pacientes con DMD. Para ello se utilizaron fibroblastos de 3 pacientes DMD y se trataron durante 4 días con 50 ng/ml de PDGF-AA. Comparamos la expresión de proteínas en fibroblastos tratados y no tratados mediante un análisis proteómico cuantitativo. Obtuvimos un total de 1892 proteínas analizadas de las cuales 992 estaban aumentadas tras el tratamiento con PDGF-AA. Los resultados obtenidos se resumieron en un mapa proteómico para visualizar la composición de los proteomas en términos de abundancia y función de las proteínas. En la figura 23, cada proteína está representada por un polígono, y el área de cada polígono refleja la abundancia de las proteínas (calculada con *fold-change*).



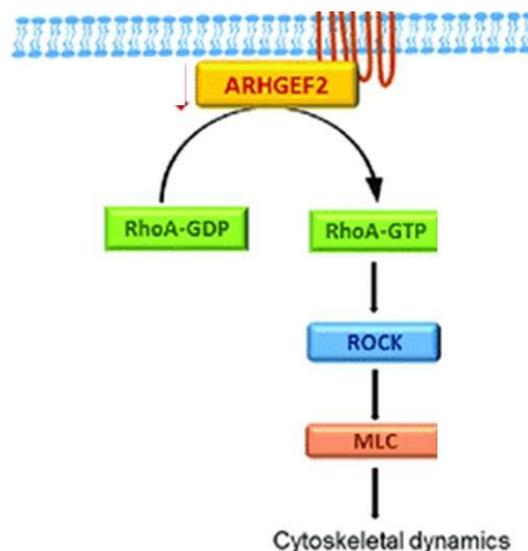
**Figura 23. Representación del análisis proteómico cuantitativo basado en las proteínas sobreexpresadas en fibroblastos tratados con PDGF-AA.** El mapa representa las 992 proteínas sobre expresadas tras el tratamiento con PDGF-AA. El *fold-change* se calculó dividiendo la expresión de fibroblastos tratados con PDGF-AA entre los no tratados. El área de cada polígono representa el *fold-change* calculado, y por tanto la abundancia de las proteínas sobreexpresadas con el tratamiento de PDGF-AA.

Las proteínas relacionadas funcionalmente aparecen en regiones adyacentes. Destacan proteínas involucradas en varias vías de señalización (MAPK, PI3K-Akt), proteínas implicadas en metabolismo y proteínas ribosomales. Entre los diferentes grupos, nos centramos en aquellas proteínas implicadas en la activación de fibroblastos (función en el citoesqueleto, adhesión celular y proteínas implicadas en la

regulación de actina) (grupos marcados en verde). Observamos que las proteínas de la familia de Rho estaban aumentadas en los fibroblastos tratados con PDGF-AA. Esta familia de GTPasas tienen un papel central en la regulación de la morfología, polaridad y movimiento celular (214). Entre las distintas proteínas de esta familia, nos centramos en la vía de RhoA ya que es una vía implicada en activación de fibroblastos y desarrollo de fibrosis en otras patologías (215–218).

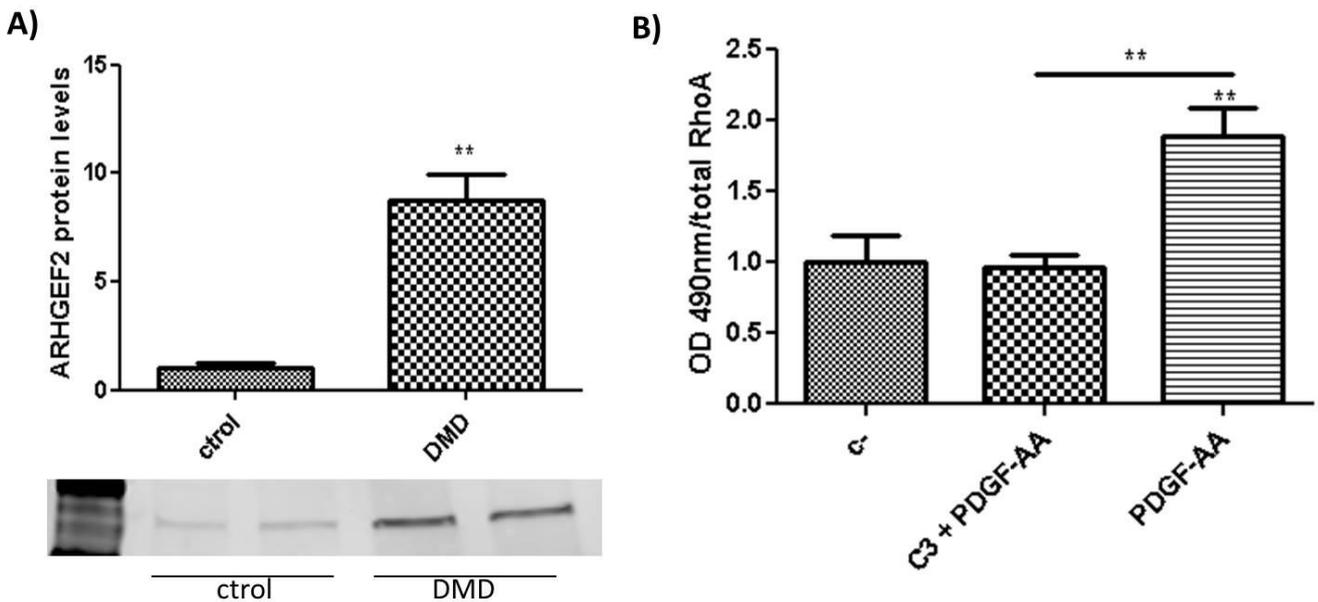
### 5.2.3. Análisis vía RhoA

A continuación, quisimos confirmar que la vía de RhoA estaba aumentada en el músculo esquelético de los pacientes DMD. Para ello estudiamos la expresión de la primera proteína implicada en la vía de señalización, el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rho 2 (ArhGEF2). ArhGEF2 es una proteína de membrana que promueve la ribosilación de RhoA. RhoA unido a guanidina trifosfato (GTP) (RhoA-GTP) estimula la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK), la cual promueve la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC). MLC fosforilada (p-MLC) induce la polimerización de la actina filamentosa y consecuentemente se incentiva la adhesión y migración celular (Figura 24).



**Figura 24. Vía de señalización de RhoA.** La proteína de membrana ARHGEF2 promueve la activación de RhoA-GTP, la cual activará la quinasa ROCK. ROCK fosforila MLC i finalmente MLC fosforilada promueve la unión a los filamentos de actina (F-actina) permitiendo la polimerización de ésta.

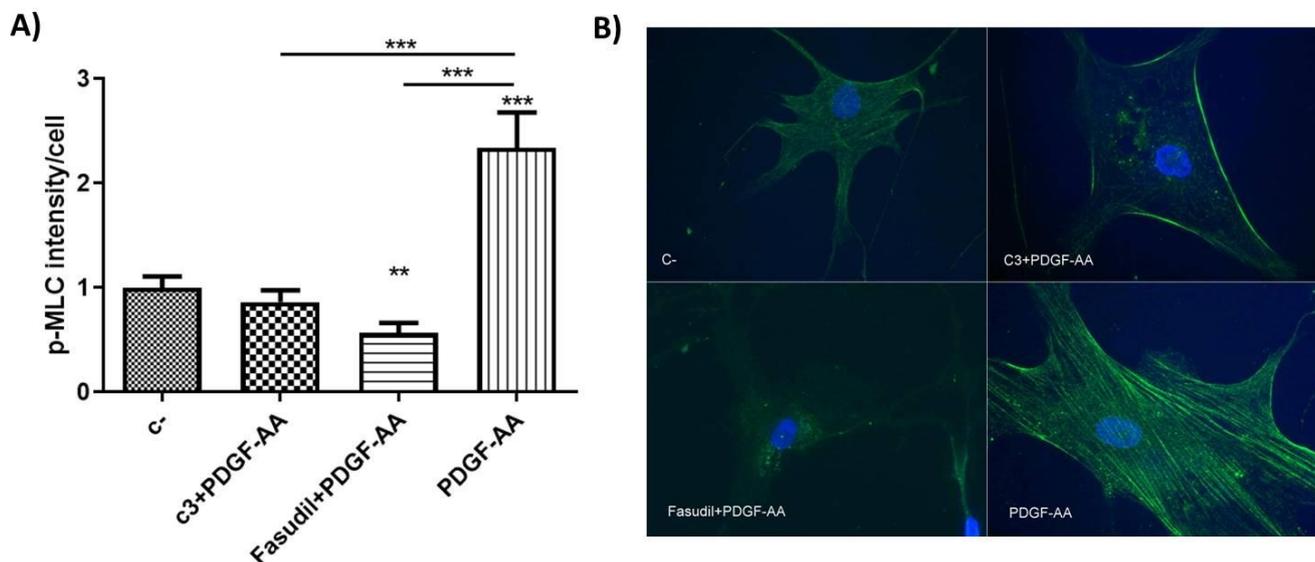
Analizamos la expresión de ArhGEF2 en biopsias musculares de 2 pacientes DMD y 2 controles sanos mediante WB (Figura 25A) y observamos que ArhGEF2 se encontraba significativamente aumentada. Para comprobar que el PDGF-AA promovía la regulación de la vía de RhoA, se realizaron estudios *in vitro* con fibroblastos derivados de 3 pacientes DMD. Como se muestra en la figura 25B, la estimulación con PDGF-AA a 50ng/ml inducía un aumento estadísticamente significativo de RhoA-GTP comparado con fibroblastos no tratados (c-). Para completar los estudios moleculares, decidimos utilizar el C3 exoenzima (C3) que es una ADP ribosil transferasa que ribosila selectivamente las proteínas RhoA en el residuo de asparagina 41, inactivando la activación de RhoA. El tratamiento de fibroblastos *in vitro* con C3 a dosis de 2 µg/ml, previo a la estimulación con PDGF-AA a 50ng/ml, disminuyó significativamente los niveles de RhoA-GTP comparándolo con los fibroblastos tratados con PDGF-AA a 50ng/ml.



**Figura 25. Expresión de ArhGEF2 en músculo y RhoA-GTP *in vitro* tras distintos tratamientos.** A) WB ArhGEF2 en músculo procedente de controles sanos (ctrol) (n=2) y pacientes DMD (n=2). Como control de carga se cuantificaron el total de proteínas cargadas con el kit Revert (Li-COR) B) Representación gráfica de los niveles de RhoA-GTP obtenidos a partir de un G-LISA calculados respecto a la cuantificación de RhoA total por WB. Las condiciones utilizadas con los fibroblastos fueron; no

tratados (c-), inhibidos con C3 a 2  $\mu\text{g/ml}$  durante 15 horas previas a la activación con PDGF-AA a 50  $\text{ng/ml}$  (C3 + PDGF-AA) y estimulados solo con PDGF-AA a 50  $\text{ng/ml}$ . Los datos se representan como la media de 3 réplicas  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante el test U de Mann Whinthey: \* $p \leq 0.05$  y \*\* $p \leq 0.01$ .

Al comprobar que PDGF-AA activaba la vía de RhoA buscamos un inhibidor que pudiese utilizarse como posible fármaco en pacientes con distrofias musculares. Decidimos utilizar el fasudil, un inhibidor de la vía de RhoA que actúa sobre la proteína quinasa ROCK que a su vez fosforila la cadena ligera de la miosina (MLC). Como el fasudil inhibe ROCK, analizamos la fosforilación de MLC (p-MLC). Como se muestra en la figura 26, la estimulación con 50  $\text{ng/ml}$  de PDGF-AA incrementó la fosforilación de MLC comparado con los fibroblastos no tratados y con los tratados con inhibidores. Los niveles de p-MLC disminuyeron significativamente con la adición previa de los inhibidores en comparación con la adición individual de PDGF-AA. El tratamiento con fasudil previo a la estimulación con PDGF-AA resultó en una disminución estadísticamente significativa al compararlo con los fibroblastos no tratados.



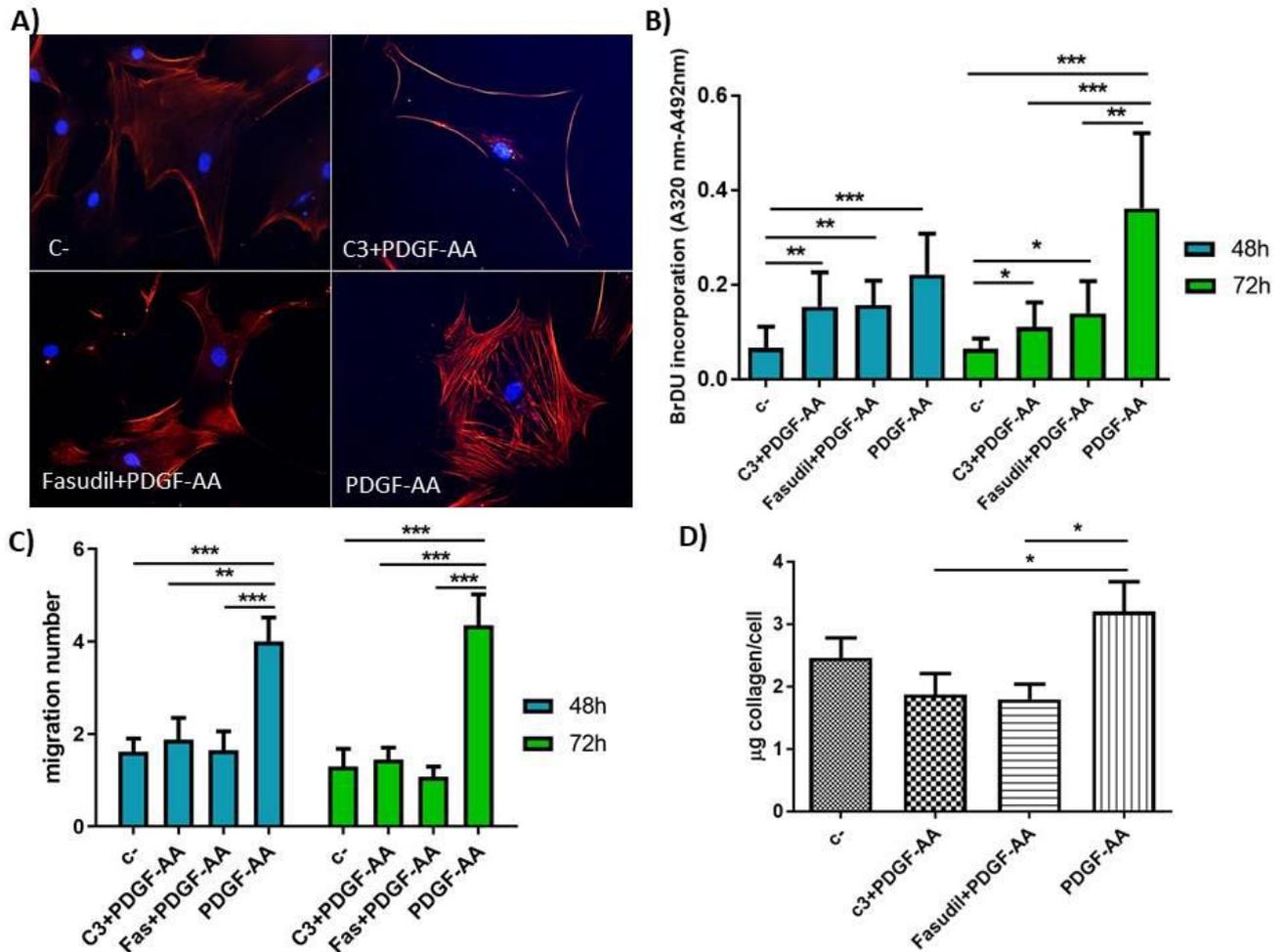
**Figura 26. Efectos de C3, Fasudil y PDGF-AA en la fosforilación de MLC.** A) Representación gráfica de la intensidad de p-MLC calculada a partir de la IF. El análisis de la imagen se hizo a partir de la intensidad obtenida por célula, a partir de fibroblastos obtenidos de pacientes DMD ( $n=3$ ). Las condiciones utilizadas con los fibroblastos fueron; no tratados (c-), inhibidos con C3 a 2  $\mu\text{g/ml}$  durante 15 horas previas a la activación con PDGF-AA a 50  $\text{ng/ml}$  (C3 + PDGF-AA), inhibidos con fasudil a 50 $\mu\text{M}$  15 horas previas a la activación PDGFAA a 50  $\text{ng/ml}$  y estimulados solo con PDGF-AA a 50  $\text{ng/ml}$ . Los datos representan la media de 10 células calculadas por procedente, siendo el total 3 pacientes ( $n=3$ )  $\pm$  desviación estándar.

Se estudiaron si las diferencias eran estadísticamente significativas mediante el test U de Mann Whinthey: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ . B) Representación de IF de p-MLC con los distintos tratamientos.

#### **5.2.4. Efectos del PDGF-AA, C3 y fasudil en la expresión de actina filamentosa y colágeno. Efectos en la proliferación y migración**

La fosforilación de MLC promueve la unión a los filamentos de actina (F-actina) permitiendo la polimerización de ésta. La IF de F-actina en fibroblastos tratados con 50 ng/ml de PDGF-AA demostró que los filamentos de actina estaban presentes en toda la célula, como puede verse en la figura 27A. La expresión de F-actina era mayor en los fibroblastos tratados con PDGF-AA que en los no tratados. La combinación de C3 y fasudil con 50 ng/ml de PDGF-AA disminuyó la expresión de filamentos de actina intracelulares al compararlo con el tratamiento de PDGF-AA solo y con los fibroblastos no tratados.

La proliferación de los fibroblastos se determinó mediante un ensayo de BrdU a 48 y 72 horas. Observamos que el tratamiento con 50 ng/ml de PDGF-AA aumentaba significativamente la proliferación de fibroblastos tanto a 48 como 72h en comparación a los fibroblastos no tratados. En cambio, la inhibición con C3 y fasudil previa a la estimulación con PDGF-AA disminuía significativamente la proliferación en comparación con los fibroblastos tratados con PDGF-AA a las 72 horas, efecto que no vimos a las 48 horas. En ambos tiempos, el tratamiento con inhibidores presentó un aumento de la proliferación en comparación con los fibroblastos no tratados (Figura 27B).



**Figura 27. Contenido F-actina, proliferación, migración y expresión de colágeno en fibroblastos DMD tratados con PDGF-AA, C3 y Fasudil.** A) Expresión de F-actina en fibroblastos no tratados (c-), inhibidos con exoenzima C3 a 2 µg/ml durante 15 horas previas a la activación con PDGF-AA a 50 ng/ml (C3 + PDGF-AA), inhibidos con Fasudil a 50µM 15 horas previas a la activación PDGF-AA a 50 ng/ml y estimulados solo con PDGF-AA a 50 ng/ml. B) Representación gráfica de la proliferación medida a partir de la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) a 48 y 72 horas. Las células se trataron diariamente con PDGF-AA, fasudil y C3. C) Representación gráfica de la migración celular calculada según el número de células migratorias a 48 y 72 horas. Los tratamientos y tiempos fueron los mismos que en los experimentos de proliferación. D) Representación gráfica de la cantidad de colágeno secretada por fibroblastos tras 4 días de tratamiento con PDGF-AA, fasudil y C3. Los datos representan la media obtenida de los resultados de los fibroblastos procedentes de 3 pacientes DMD (n=3) ± desviación estándar. Se estudiaron si las diferencias eran estadísticamente significativas mediante el test U de Mann Whinthey: \*p ≤ 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\* p ≤ 0.001.

El efecto en la migración de los distintos tratamientos se midió usando placas con insertos que separan 2 cámaras. El tratamiento con 50 ng/ml de PDGF-AA se asoció a un aumento significativo de células migratorias en comparación a los fibroblastos no tratados tanto a las 48 como 72 horas. El pretratamiento con el inhibidor C3 y fasudil

disminuyó significativamente la migración celular en los 2 tiempos al compararlo con la condición de tratamiento de PDGF-AA solo (Figura 27C).

Finalmente quisimos evaluar la expresión de colágeno de los fibroblastos en cultivo. Para ello medimos el contenido de colágeno en el sobrenadante tras 4 días de tratamiento mediante el kit comercial Sircol. Tanto la combinación de C3 y fasudil con 50 ng/ml de PDGF-AA disminuyó la expresión de colágeno significativamente al compararlo con el tratamiento de PDGF-AA. Los fibroblastos tratados con PDGF-AA aumentaron la expresión de colágeno comparándolo con los no tratados pero no presentaron cambios estadísticamente significativos (Figura 27D).

### 5.3. Búsqueda de nuevos biomarcadores en distrofias musculares y enfermedad de Pompe

El objetivo principal de este estudio fue analizar el comportamiento de 4 biomarcadores profibróticos (PDGF-AA, PDGF-BB, CTGF y TGF-β1) en muestras serológicas de pacientes DMD, BMD, LGMD-R2 y Pompe.

#### 5.3.1. Biomarcadores en enfermedad de Pompe

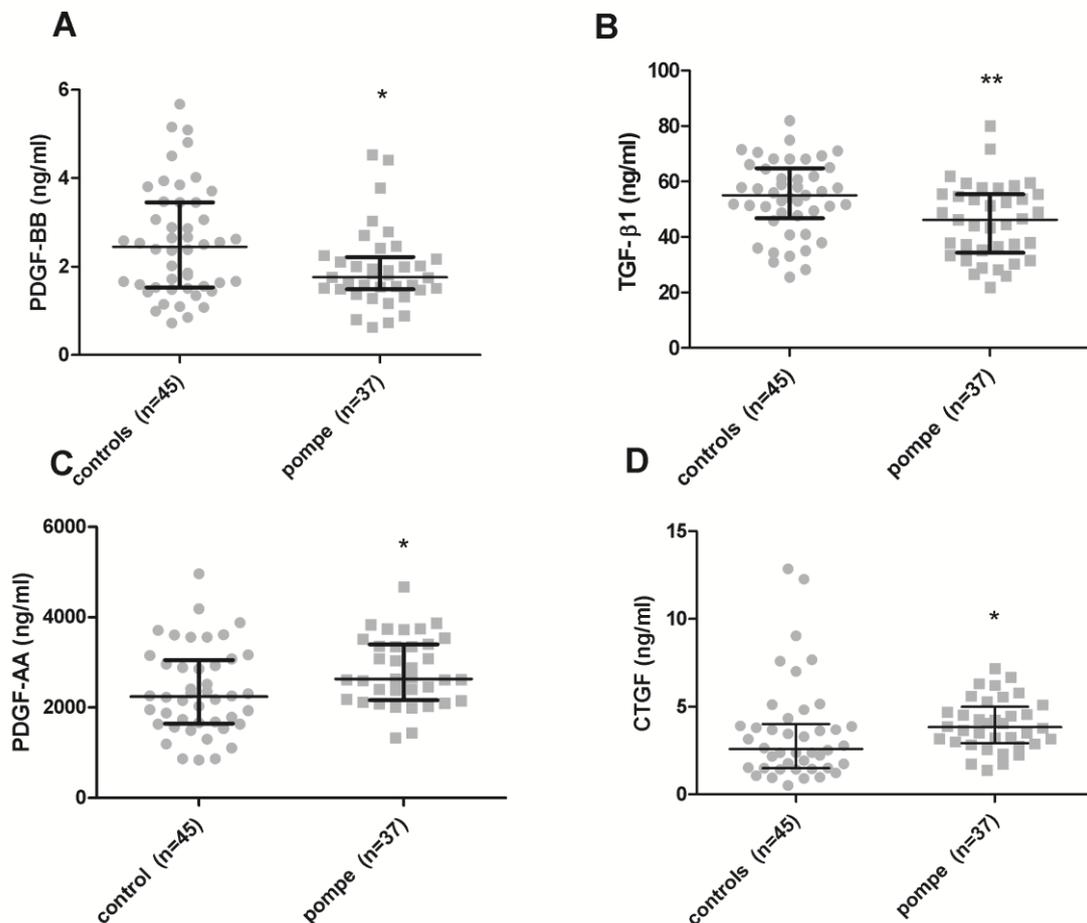
El primer objetivo consistió en estudiar si existían diferencias entre un grupo de factores de crecimiento (PDGF-BB, TGF-β1, PDGF-AA i CTGF) en suero entre controles sanos y pacientes con enfermedad de Pompe. En la tabla 1 se muestra la descripción de la cohorte. En total, se estudiaron 37 pacientes Pompe.

	Pacientes		
	Sintomáticos	Asintomáticos	p*
Número pacientes	29	8	
Sexo (M)	18 (62.1%)	4 (50%)	0.21
Edad	51 (31-65)	21 (8-51)	0.001
Tiempo desde inicio de los síntomas	17 (4-42)		
Pacientes bajo tratamiento	22	-	

Tiempo en tratamiento	4.3 (1-9)	-	
Ayudas para andar	10	-	
Ventilación	13	-	

**Tabla 1. Datos clínicos y demográficos de pacientes Pompe.** Las comparaciones entre pacientes sintomáticos y asintomáticos se muestran con el p valor. Se consideró p significativo si era menor de 0.05.

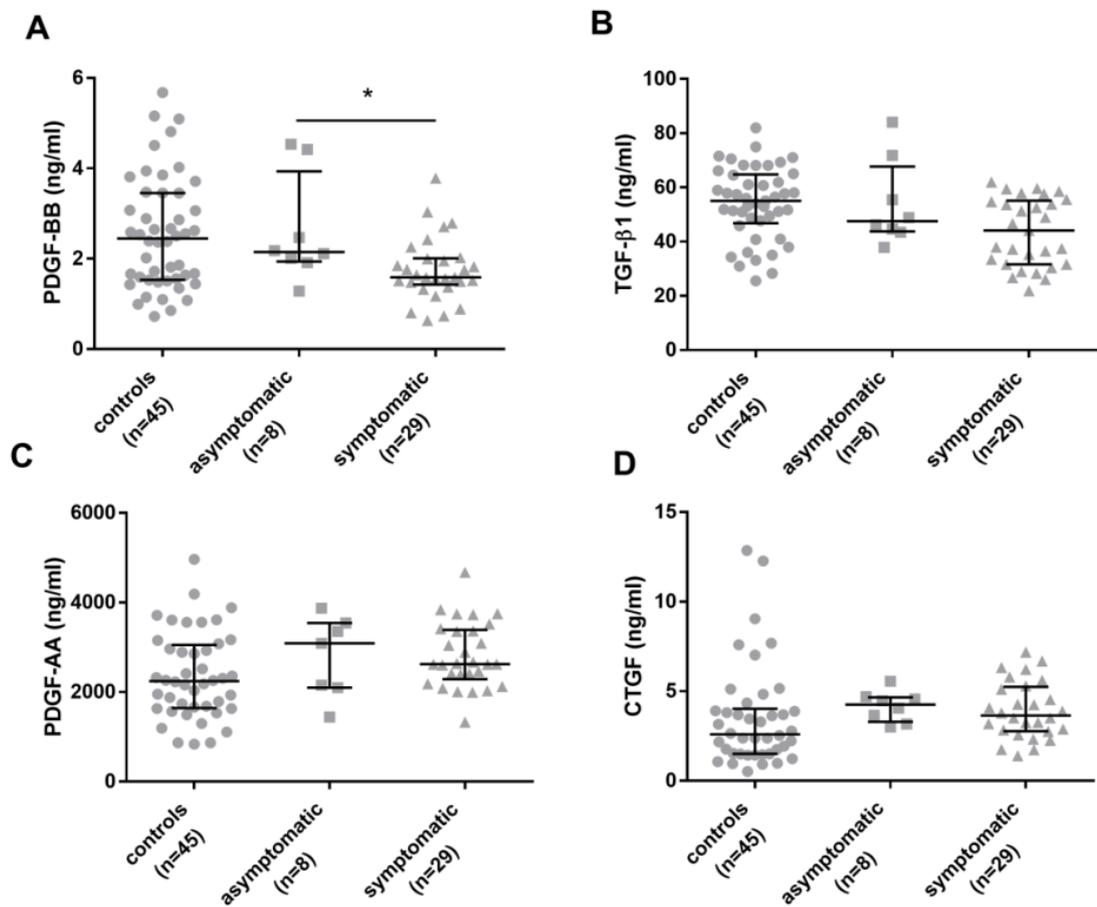
Observamos diferencias significativas con los 4 factores de crecimiento (Figura 28). Los niveles de PDGF-BB y TGF- $\beta$ 1 (figura 28A-B) estaban significativamente disminuidos en pacientes Pompe comparados con los controles sanos, mientras que los niveles PDGF-AA y CTGF (figura 28C-D) presentaron una concentración significativamente mayor en pacientes Pompe comparado con controles sanos.



**Figura 28. Niveles serológicos de diferentes factores de crecimiento en grupos controles y Pompe.** Los niveles de A) PDGF-AA, B) PDGF-BB, c) TGF- $\beta$ 1 y d) CTGF se midieron mediante ELISAs. Las variables representadas son media y rango intercuartil (IQR). Se estudiaron si las diferencias eran estadísticamente significativas mediante el test U de Mann Whitney: \*p  $\leq$  0.05 y \*\*p  $\leq$  0.01.

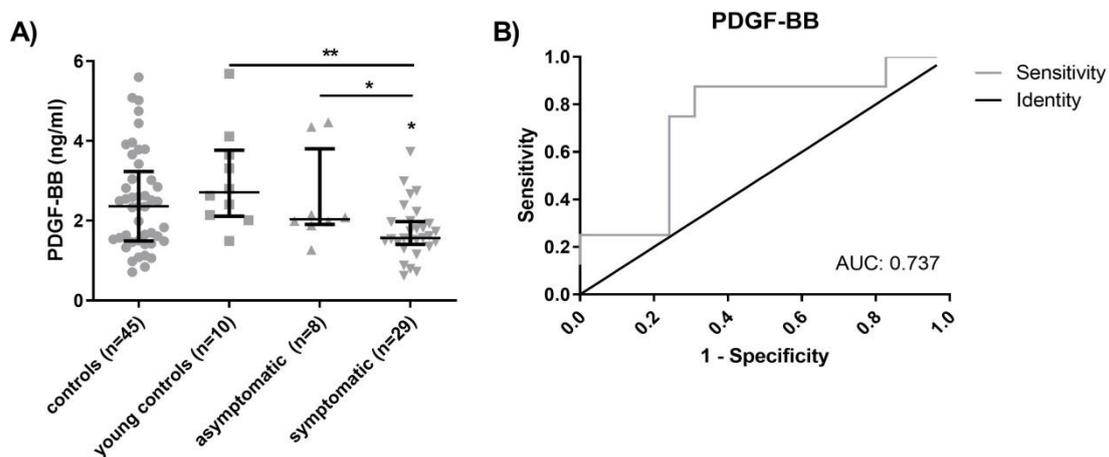
### 5.3.1.1. PDGF-BB diferencia entre pacientes Pompe sintomáticos y asintomáticos

Nuestro siguiente objetivo consistió en evaluar si la concentración en suero de algún factor de crecimiento profibrótico podía ser diferente entre los pacientes sintomáticos y asintomáticos (Figura 29). Observamos que los niveles de PDGF-BB eran significativamente inferiores en los pacientes sintomáticos comparados con los asintomáticos. En cambio, no encontramos diferencias significativas en ninguno de los restantes factores de crecimiento entre los grupos sintomáticos y asintomáticos.



**Figura 29.** Niveles serológicos de 4 factores de crecimiento profibróticos en 3 grupos diferentes: controles, pacientes Pompe asintomáticos y pacientes Pompe sintomáticos. Se estudiaron los niveles de A) PDGF-BB, B) TGF-β1, C) PDGF-AA y D)CTGF. Las variables están representadas como media y rango intercuartil (IQR). Se estudió si existían diferencias significativas entre los grupos mediante la prueba U de Mann Whitney: \*p ≤ 0.05.

Debido a que existen diferencias significativas en la edad entre pacientes sintomáticos y asintomáticos (Tabla 1), decidimos añadir un grupo de controles jóvenes sanos, donde la edad media eran 23 años para estudiar mejor los niveles de PDGF-BB en suero. Observamos diferencias significativas en los niveles de PDGF-BB entre pacientes sintomáticos y el grupo de controles jóvenes y asintomáticos. Por otro lado, no vimos diferencias significativas entre los grupos controles de diferentes edades ni entre el grupo de pacientes asintomáticos y controles jóvenes (Figura 30A). Estos resultados nos indican que las diferencias en los niveles de PDGF-BB entre pacientes sintomáticos y asintomáticos no eran el resultado de la diferencia de edad.



**Figura 30. Niveles serológicos de PDGF-BB en diferentes grupos y curva ROC.** A) Grupos estudiados: controles, controles jóvenes, pacientes con la enfermedad de Pompe asintomáticos y **sintomáticos**. Las variables están representadas como media y rango intercuartil (IQR). Se estudió si existían diferencias significativas entre los grupos mediante la prueba U de Mann Whitney: \* $p \leq 0.05$ . B) Curva ROC del factor PDGF-BB para distinguir entre pacientes sintomáticos y asintomáticos. El área bajo la curva (AUC) es de 0.737 con un p valor de 0.042 y el 95% de intervalo de confianza (CI) era de 0.539-0.935

Para estudiar si los niveles de PDGF-BB eran de utilidad para diferenciar entre pacientes sintomáticos y asintomáticos, usamos la teoría de detección de señales, también conocida como curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Este tipo de análisis permite calcular el área bajo la curva (AUC) que se interpreta como la probabilidad de que ante un par de situaciones (sintomático o asintomático), una prueba determinada clasifique a un individuo correctamente. La curva ROC nos

permitió confirmar que los niveles de PDGF-BB en suero eran capaces de clasificar de forma correcta a los pacientes con un valor estadísticamente significativo (Figura 30B). El AUC era de 0.737. Elegimos como punto de corte un valor de 1.97ng/ml ya que ese valor tenía el mejor equilibrio de sensibilidad (75%) y especificidad (76%) respectivamente.

### 5.3.1.2. Correlación entre PDGF-BB y resultados de pruebas funcionales y qMRI

Finalmente quisimos estudiar las correlaciones entre los niveles de PDGF-BB con los resultados obtenidos en las pruebas de función muscular, espirometría o los resultados de qMRI, específicamente la fracción de grasa media en los muslos. Como se muestra en la tabla 2, no encontramos ninguna correlación significativa, aunque existía alguna tendencia entre los niveles de PDGF-BB y los resultados del 6MWT, la fuerza muscular medida mediante la escala de MRC, la fuerza muscular medida mediante miometría de mano, el valor de MIP de la espirometría y los resultados de la fracción grasa de los muslos.

Prueba	Spearman	Coefficiente de correlación
<b>Prueba de función muscular</b>		
6 MWT	0.055	0.33
Tiempo en andar 10 metros	0.24	
Tiempo en subir 4 escalones	0.17	
Tiempo en bajar 4 escalones	0.26	
MRC	0.07	0.31
Miometría de mano	0.07	0.31
MFM-20	0.77	
<b>Espirometria</b>		
FVC sentado	1	
FVC tumbado	0.28	
MIP	0.057	-0.48
MEP	0.80	
<b>Estado del paciente</b>		
Activlim	0.84	

SF36	0.80	
INQoL	0.70	
<b>Resonancia magnética cuantitativa</b>		
Fracción grasa muslos	0.08	-0.28
Fracción grasa paraespinal	0.2	

**Tabla 2. Correlación entre niveles de PDGF-BB y resultados de las pruebas de función muscular, espirometría, estado del paciente y resultados de qMRI.** El coeficiente de correlación se muestra para las variables. 6MWT: metros andados en 6 minutos, MRC: *Medical Research Council*, MFM-20: escala funcional motora 20, FVC: capacidad vital forzada, MIP: presión inspiratoria máxima, MEP: presión expiratoria máxima, Activlim: escalas de actividades diarias, INQoL: cuestionario neuromuscular individualizado de calidad de vida

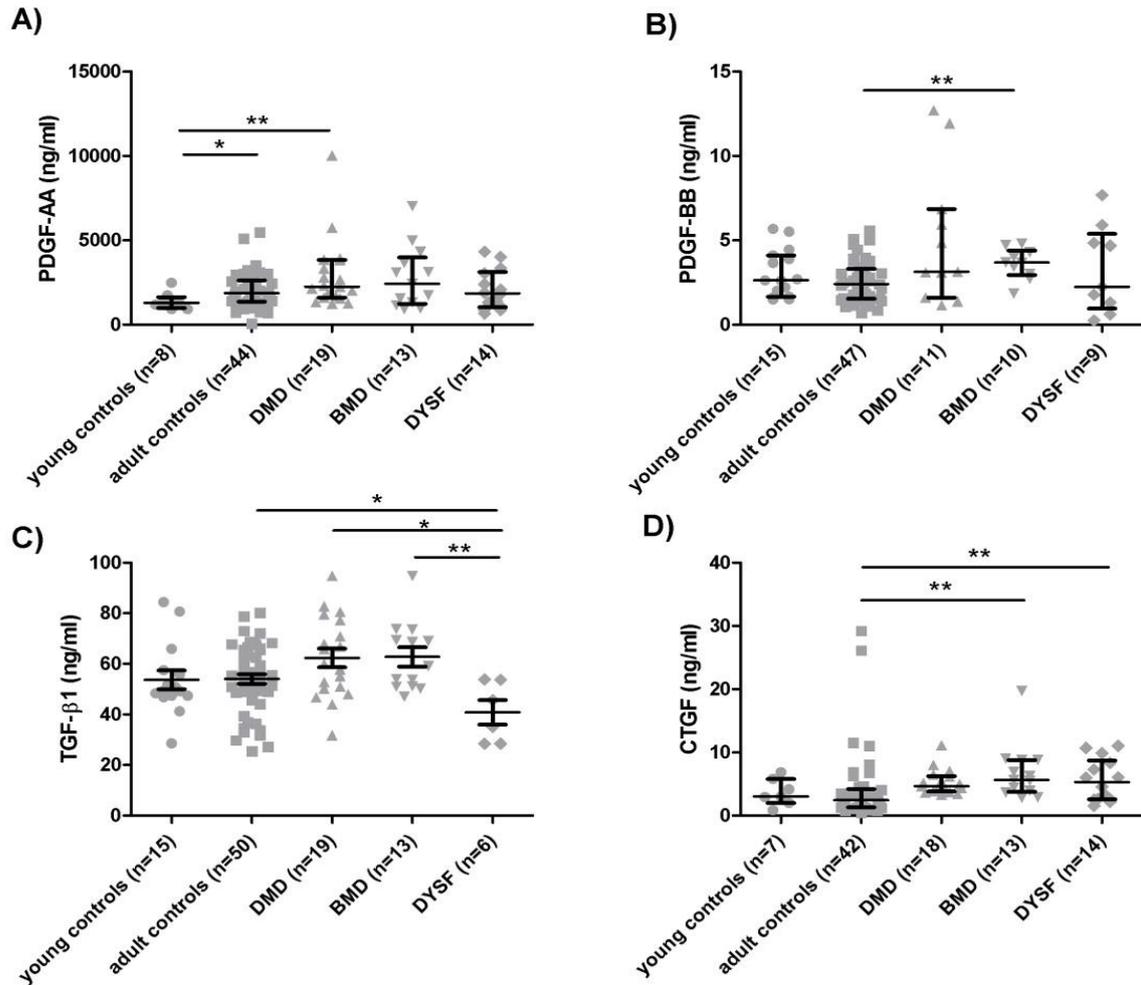
### 5.3.2. Biomarcadores en distrofias musculares

El primer objetivo consistió en estudiar si existían diferencias entre un grupo de factores de crecimiento relacionados con el proceso fibrótico muscular en suero entre controles sanos y pacientes con diversas distrofias musculares. El grupo de pacientes sanos se dividió entre jóvenes (edad < de 25) y adultos (edad > de 25) para poder comparar el grupo DMD con los controles jóvenes y los grupos BMD, y LGMD-2R con los controles adultos. En la tabla 3 se describen los datos demográficos de los pacientes en estudio.

	Pacientes				
	Controles jóvenes	Controles adultos	DMD	BMD	DYSF
Número pacientes	15	50	19	12	13
Edad	16.31±6.68	45.58±13.68	10.44±5.79	31.23±20.59	46.66±14.66
Pacientes bajo tratamiento*	-	-	14	0	0
No Ambulantes	-	-	5	5	4
Ventilación	-	-	14	5	1

**Tabla 3. Datos clínicos y demográficos de grupos en estudio.** El grupo de controles sanos se dividió entre adultos (>25) y jóvenes (<25). \*Los pacientes con enfermedad de Duchenne recibían tratamiento con corticoides a dosis variables.

En la figura 31 hemos representado los valores obtenidos de cada grupo. En el caso del PDGF-AA, solo obtuvimos diferencias significativas cuando el grupo DMD se comparó con el grupo de controles jóvenes. Además los niveles de PDGF-AA eran significativamente más elevados en controles sanos adultos comparado con los jóvenes. Respecto al CTGF y PDGF-BB, los niveles serológicos en pacientes con BMD fueron significativamente más altos que en el grupo de controles. Finalmente, en la cohorte de LGMD-R2, los niveles de CTGF y TGF- $\beta$ 1 presentaron diferencias significativas al compararlos con el grupo control. En el caso del CTGF los niveles en suero eran más elevados en el grupo LGMD-R2 respecto al grupo control mientras que con el TGF- $\beta$ 1 ocurría lo contrario y los niveles en suero eran más bajos que en controles. Además, el TGF- $\beta$ 1 también era significativamente más bajo en pacientes LGMD-R2 que en pacientes DMD y BMD.

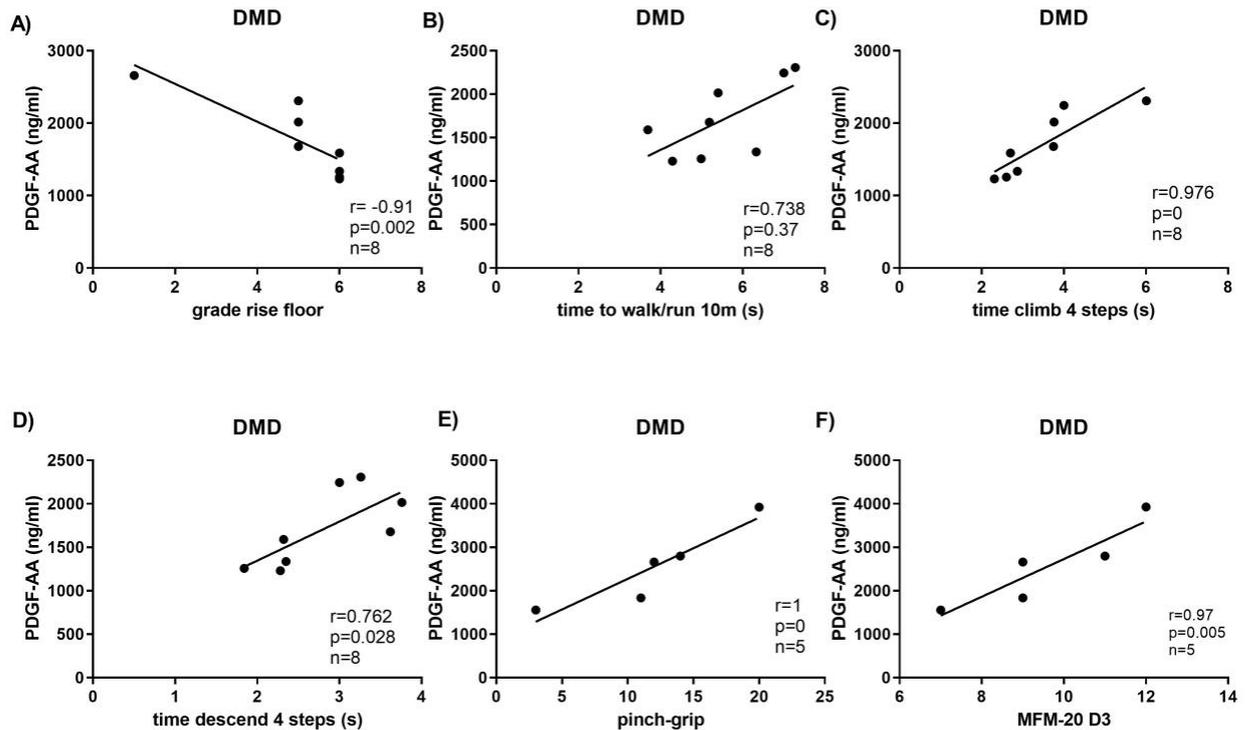


**Figura 31. Niveles serológicos de diferentes factores de crecimiento en grupos controles jóvenes, adultos, DMD, BMD y LGMD-R2.** Los niveles de A) PDGF-AA, B) PDGF-BB, c) TGF-β y d) CTGF se midieron mediante ELISAs. Las variables representadas son media y rango intercuartil (IQR). Se estudiaron si las diferencias eran estadísticamente significativas mediante el test U de Mann Whinthey: \*p ≤ 0.05 y \*\*p ≤ 0.01.

### 5.3.2.1. Correlación biomarcadores y resultados de las pruebas funcionales

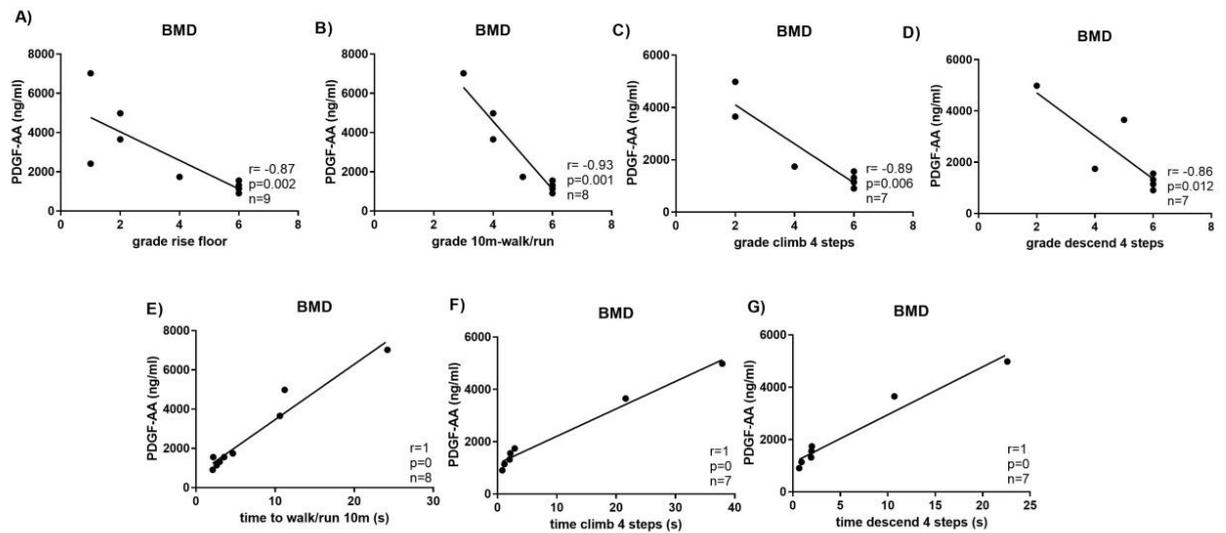
En el caso de las distrofias musculares, el objetivo se centró en buscar correlaciones de las concentraciones de factores de crecimiento profibróticos con resultados de diferentes pruebas funcionales para poder evaluar la progresión de la enfermedad. Encontramos correlaciones estadísticamente significativas en el grupo de DMD y BMD. En el caso de DMD las correlaciones eran significativas solamente con los resultados obtenidos con PDGF-AA (Figura 32). La calificación para levantarse del

suelo correlacionó negativamente con el PDGF-AA (Fig. 32A). Contrariamente, el tiempo para andar 10 metros, tiempo para subir/bajar 4 escalones correlacionó positivamente (Figura 36B-D). Las medidas de *pinch grip* (agarre en pinza) y MFM-20 D3 también correlacionaron positivamente con los niveles de PDGF-AA (Figura 32E-F).



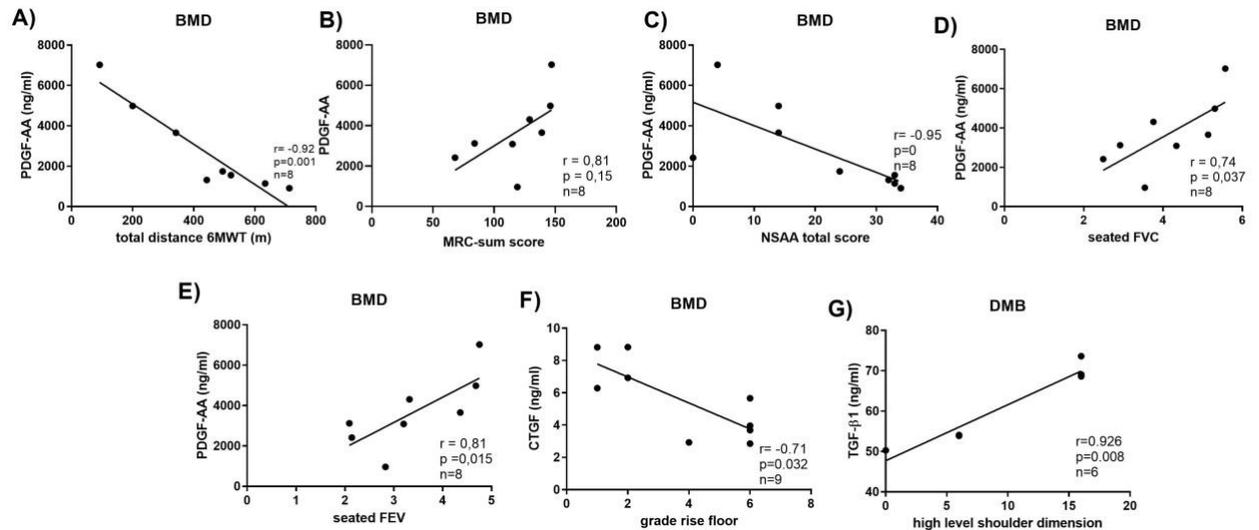
**Figura 32.** Correlaciones de pruebas funcionales con los niveles de PDGF-AA en pacientes DMD. A) Calificación para levantarse del suelo, B) tiempo para andar 10 metros, C) tiempo para subir 4 escalones, D) tiempo para bajar 4 escalones, E) medidas del agarre en forma de pinza y F) MFM-20 D3. Se estudiaron si las correlaciones eran estadísticamente significativas mediante el análisis Rho de Spearman. M: metros, s: segundos.

Paralelamente, en la cohorte de BMD obtuvimos correlaciones significativas con los factores PDGF-AA, CTGF y TGF- $\beta$ 1. La calificación para levantarse del suelo, andar 10 metros y subir/bajar 4 escalones correlacionaron negativamente con los niveles de PDGF-AA (Fig.33A-D). Por otro lado, el tiempo para andar 10 metros, subir/bajar 4 escalones correlacionaron positivamente con la concentración de PDGF-AA en suero (Figura 33E-G).



**Figura 33. Correlaciones de pruebas funcionales con los resultados de PDGF-AA en pacientes BMD.** A) Calificación obtenida en levantarse del suelo, B) en andar 10 metros, C) en subir 4 escalones, D) en bajar 4 escalones, E) tiempo en andar 10 metros, F) subir 4 escalones y G) bajar 4 escalones. Se estudiaron si las correlaciones eran significativamente estadísticas mediante el análisis Rho de Spearman. m: metros

El tiempo para realizar la prueba de 6MWT mostró una correlación negativa con los niveles de PDGF-AA (figura 34A). La fuerza muscular se evaluó con la escala MRC y la suma obtenida de las medidas de los músculos individuales correlacionó positivamente con la concentración de PDGF-AA (figura 34B). La habilidad de los pacientes de hacer una serie de pruebas de movilidad independientemente (NSAA) también fue medida y observamos una correlación negativa con los niveles de PDGF-AA en suero en la cohorte BMD (figura 34C). Los resultados de la función respiratoria también presentaron correlaciones significativas con el PDGF-AA: los valores de FVC y FEV en posición sentada correlacionaron positivamente con el PDGF-AA (Figura 34D-E).



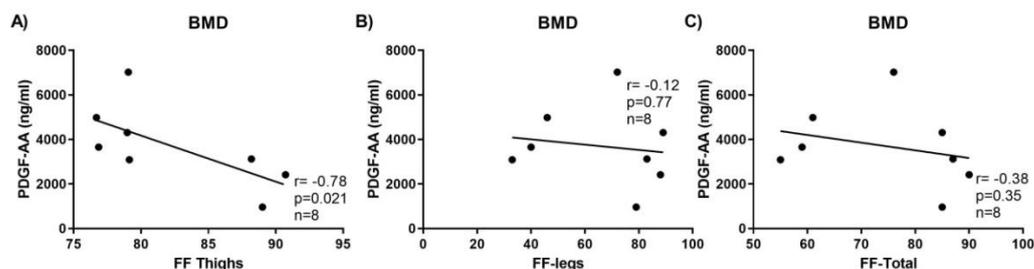
**Figura 34. Correlaciones entre los niveles de PDGF-AA, CTGF y TGF-β1 y resultados de pruebas funcionales y respiratorias en la cohorte BMD.** A) 6MWT: metros andados en 6 minutos, B) sumatorio obtenido con la MRC de músculos individuales, C) valor de NSAA, D) FVC: capacidad vital forzada sentado, E) FEV: volumen espiratorio forzado sentado, G) movimiento del hombro. Se estudiaron si las correlaciones eran estadísticamente significativas mediante el análisis Rho de Spearman. m: metros.

En el caso del CTGF, solo se observaron correlaciones estadísticamente significativas cuando se estudió la calificación obtenida en la prueba de levantarse del suelo (Figura 34F). Y en relación al TGF-β1, la correlación estadística se encontró con el movimiento del hombro (Figura 34G).

### 5.3.2.2. Correlación entre biomarcadores y resultados de qMRI

Finalmente analizamos las correlaciones entre las citoquinas serológicas y los resultados de la qMRI.

La fracción de grasa media total en extremidad inferior, grasa media en muslos y grasa media en piernas fue medida en las pruebas adquiridas de qMRI con secuencias Dixon. Los pacientes BMD presentaron correlaciones negativas entre la qMRI y los niveles de PDGF-AA (Figura 35A-C). En los pacientes DMD no se encontraron correlaciones significativas.



**Figura 35. Correlaciones de resultados de qMRI en pacientes DMD.** Fracción grasa calculada en A) muslos, B) piernas y C) en las extremidades inferiores. Se estudiaron si las correlaciones eran estadísticamente significativas mediante el análisis Rho de Spearman

Todas las correlaciones estadísticamente significativas se recogen en la tabla 4.

Prueba	Factor serológico	Grupo en estudio	Spearman	Coefficiente de correlación
<b>Prueba de función muscular</b>				
Calificación levantarse del suelo	PDGF-AA	DMD	0.002	-0.91
		BMD	0.002	-0.91
	CTGF	BMD	0.032	-0.71
Tiempo en andar 10 metros	PDGF-AA	DMD	0.37	0.74
		BMD	0	0.74
Calificación andar 10 metros	PDGF-AA	DMD	0.002	-0.91
		BMD	0.001	-0.93
Tiempo en subir 4 escalones	PDGF-AA	DMD	0	0.97
		BMD	0	1
Calificación subir 4 escalones	PDGF-AA	BMD	0.012	-0.86
Tiempo en bajar 4 escalones	PDGF-AA	DMD	0.028	0.76
		BMD	0	1
Calificación bajar 4 escalones	PDGF-AA	BMD	0.012	-0.86
MFM-20 -D3	PDGF-AA	DMD	0.005	0.97
Pinch grip	PDGF-AA	DMD	0	1
6MWT	PDGF-AA	BMD	0.001	-0.92
NSAA	PDGF-AA	BMD	0	-0.95
Movimiento del hombro	TGF- $\beta$ 1	BMD	0.008	0.926
MRC sum score	PDGF-AA	BMD	0.015	0.81
<b>Espirometría</b>				
FVC sentado	PDGF-AA	BMD	0.037	0.74
FVC tumbado	PDGF-AA	BMD	0.015	0.81
<b>Resonancia magnética cuantitativa</b>				
Fracción grasa muslos	PDGF-AA	BMD	0.027	-0.78

**Tabla 4.** Correlación entre niveles de PDGF-AA, CTGF y TGF- $\beta$ 1 y los resultados de las pruebas de función muscular, espirometría, estado del paciente y resultados de qMRI. El coeficiente de correlación se muestra para las variables. 6MWT: metros andados en 6 minutos, NSAA: North Star Ambulatory Assessment, FVC; capacidad vital fuerza

## 6. DISCUSIÓN



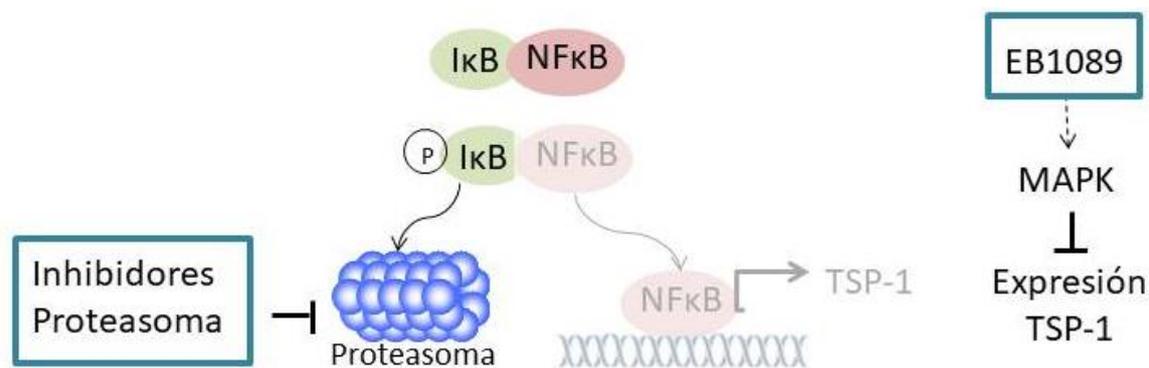
En esta tesis hemos estudiado los mecanismos involucrados en la fisiopatología de las distrofias musculares y enfermedad de Pompe a través de la investigación en nuevas aproximaciones terapéuticas y en la búsqueda de biomarcadores.

En el primer estudio analizamos el efecto de inhibidores del proteasoma en mioblastos procedentes de un paciente con LGMD-R2, ya que se ha descrito que la inhibición del proteasoma podría tener una implicación terapéutica en las distrofinopatías (153),(212). Utilizamos el oprozomib e ixazomib, dos inhibidores del proteasoma de nueva generación, que presentan una menor toxicidad y elevada efectividad. También analizamos el efecto del EB1089 (análogo de la vitamina D3) sobre la expresión de disferlina, ya que el promotor de disferlina contiene secuencias VDRE (154). Por este motivo, se testó el efecto de EB1089 en combinación con inhibidores del proteasoma en la expresión de disferlina.

Los resultados mostraron que el oprozomib e ixazomib inhibían diferentes subunidades catalíticas del proteasoma, pero el aumento de expresión de disferlina obtenido no era significativo. Analizamos también la expresión de miogenina, como marcador de la diferenciación a miotubos pero solamente se observó un ligero aumento de expresión, no significativo. Estos resultados sugieren que la vía del proteasoma no sería el principal mecanismo de degradación de la disferlina. Estudios previos muestran que la disferlina WT se degrada mayormente por el proteasoma mientras que la disferlina mutada lo haría por vías autofágicas (219).

El tratamiento con EB1089 produjo una ligera tendencia al aumento de disferlina pero sin mostrar cambios significativos, hecho que nos indica que el efecto de aumento de expresión en pacientes con disferlinopatía no sería el mismo que en portadores de una mutación del gen. Esto podría ser debido a la diferente cantidad de proteína basal que presentan los pacientes y portadores (154). La tendencia hacia una mayor expresión de disferlina obtenida con los inhibidores de proteasoma y EB1089 no fueron suficientes para recuperar la reparación del sarcolema, ya que el ensayo de reparación no mostró ningún cambio.

Mediante el análisis de la expresión de TSP-1 evaluamos el efecto de los tratamientos en la inflamación (220). Observamos una disminución significativa de los niveles de TSP-1 con el tratamiento de EB1089, oprozomib y con la combinación de oprozomib e ixazomib junto a EB1089. Aunque inicialmente pensamos que la reducción de la TSP-1 podría ser debido al ligero aumento de disferlina obtenido tras los tratamientos, el hecho que la combinación de oprozomib y EB1089 produjese una reducción aún mayor de TSP-1 que el tratamiento por separado sugiere que los inhibidores de proteasoma y el EB1089 podrían actuar independientemente de la expresión de disferlina. Estudios previos sugieren que la vitamina D reduce los niveles de TSP-1 en controles sanos (221). Además, el calcitrol, un metabolito de la vitamina D, regula negativamente la expresión de TSP-1 mediante la activación de las MAPK (222). Por tanto, la activación de la vía MAPK mediante el EB1089 podría constituir un mecanismo, no ligado a la expresión de disferlina, que reduce los niveles de TSP-1. Los inhibidores del proteasoma también podrían tener un efecto en la expresión de TSP-1 mediante la inhibición de la vía canónica de NF- $\kappa$ B. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B forma un dímero con la proteína inhibitoria I $\kappa$ B, manteniendo el complejo inactivo. Cuando se activa esta vía, I $\kappa$ B se fosforila y se degrada en el proteasoma, liberando el complejo NF- $\kappa$ B al núcleo donde regula la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria. Los inhibidores del proteasoma disminuyen la degradación de I $\kappa$ B disminuyendo la actividad de NF- $\kappa$ B (223). Por consiguiente, la reducción de TSP-1 producida por los inhibidores del proteasoma podría estar relacionada con la menor actividad de NF- $\kappa$ B en miotubos deficientes en disferlina (Figura 36). De hecho, en las distrofias musculares la actividad de NF- $\kappa$ B está activada por distintas citoquinas inflamatorias y DAMPs (224).



**Figura 36. Efecto de los inhibidores proteasoma y EB1089 en miotubos deficientes en disferlina.** El complejo NF- $\kappa$ B se mantiene inactivo cuando está unido a I $\kappa$ B. Para que NF- $\kappa$ B pueda translocarse al núcleo necesita que I $\kappa$ B se fosforile y se degrade en el proteasoma. Una vez I $\kappa$ B se ha fosforilado, el complejo NF- $\kappa$ B se transloca a núcleo y promueve la transcripción de genes implicados en la inflamación. Los inhibidores del proteasoma bloquearían la degradación de I $\kappa$ B y por tanto el complejo NF- $\kappa$ B se mantendría inactivo, bloqueando la transcripción de genes implicados en la inflamación. Por otro lado, el EB1089 podría estar inhibiendo la expresión de TSP-1 mediante la señalización de MAPK.

Por tanto, aunque los tratamientos no produjesen un aumento en la expresión de disferlina, observamos una disminución significativa de niveles de TSP-1. Estudios en células de otros pacientes nos ayudarían a determinar si este efecto es común en la LGMD-R2 y si el tratamiento para reducir la TSP-1 podría ser efectivo para disminuir la inflamación persistente en estos pacientes.

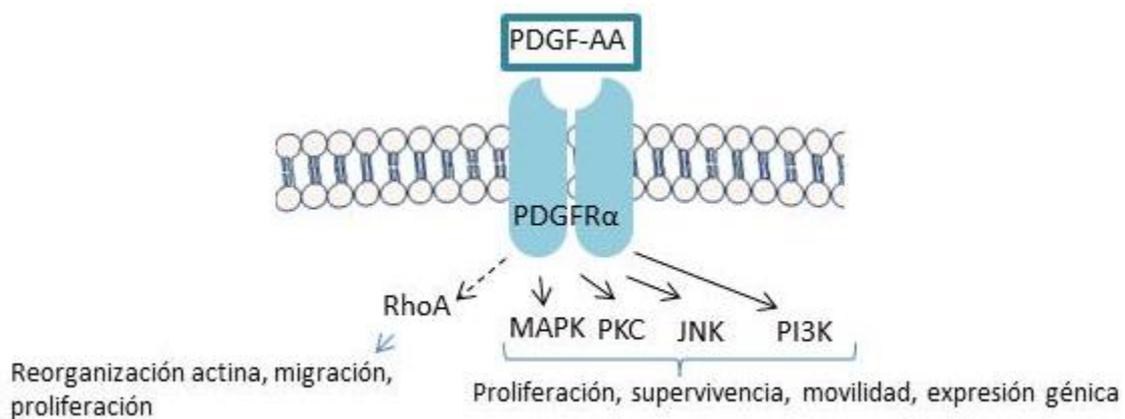
El proceso inflamatorio tras un daño muscular crónico promueve la liberación de distintos factores fibrogénicos, los cuales estimulan la activación de fibroblastos y células FAPs (93). Los factores más estudiados en las distrofias musculares son el TGF $\beta$ , CTGF y PDGF (102). Entre ellos, el PDGF-AA es el más desconocido a nivel molecular, ya que su papel en la fibrosis muscular no se conoce de forma completa. Por este motivo, quisimos estudiar qué vías activadas por PDGF-AA tenían un papel importante en la fibrosis en la DMD, ya que es la distrofia donde el proceso fibrótico es más evidente.

Primero comprobamos que el PDGF-AA estaba más expresado en fibras musculares de DMD que en controles sanos para después realizar un estudio proteómico (108). El análisis proteómico de fibroblastos procedentes de músculo esquelético de pacientes

DMD tratados con PDGF-AA reveló que existían una serie de proteínas implicadas en la adhesión celular, regulación del citoesqueleto y regulación de la actina estaban aumentadas con el tratamiento de PDGF-AA. Nos centramos en estas funciones celulares debido a que son características de la activación de fibroblastos (102). Esta activación permite a los fibroblastos incrementar su capacidad contráctil y producir una mayor cantidad de proteínas de la ECM, de modo que pueden migrar a la zona dañada y seguir proliferando promoviendo la regeneración del tejido (225). De las vías aumentadas con el tratamiento de PDGF-AA y relacionadas con el proceso de activación de fibroblastos destacaban las proteínas de la familia Rho. Entre las distintas proteínas de la familia, la vía de RhoA es la que estimula directamente la polimerización de actina (226). Además, la vía de RhoA se ha estudiado en procesos fibróticos de otras enfermedades, de hecho, se ha estudiado la señalización de PDGF-BB y RhoA en la fibrosis hepática (239,240), pero no existen evidencias de la relación PDGF-AA y RhoA en fibrosis muscular. Por este motivo decidimos estudiar la vía de RhoA en la DMD.

Confirmamos que la vía de RhoA estaba aumentada en músculo esquelético de pacientes DMD mediante la expresión de la primera proteína de la vía, ArhGEF2. Estudiamos también si la vía de RhoA se activaba por estimulación del PDGF-AA *in vitro* usando un inhibidor de RhoA-GTP (C3 exoenzyme) y un inhibidor de ROCK (fasudil) que se ha estudiado como posible terapia en la hipertensión pulmonar (229). Comprobamos que PDGF-AA estimulaba significativamente la vía de RhoA y que el uso de los 2 inhibidores por separado bloqueaba esta activación de forma significativa. Además, el PDGF-AA incrementaba la polimerización de F-actina en el citoesqueleto y que los inhibidores bloqueaban este efecto en los fibroblastos. El PDGF-AA inducía también la proliferación de fibroblastos a 48 y 72 horas y que el pretratamiento con inhibidores presentaba diferencias estadísticamente significativas al compararlo con el tratamiento de PDGF-AA solo, a las 72 horas. La inhibición de C3 y Fasudil previa a la estimulación de PDGF-AA aumentó la proliferación significativamente comparado con

los fibroblastos no tratados en los 2 tiempos. Este aumento podría ser debido a la activación de otras vías de PDGF-AA. El PDGF-AA, aparte de activar la vía de RhoA y la consecuente activación hacia fenotipo de miofibroblasto, es un factor mitógeno que mediante la activación de otras vías (MAPK, PKC o JNK) promueve la proliferación de los fibroblastos (Figura 37) (107). En cambio, la vía de RhoA promueve la activación de fibroblastos lo que implica cambios directos del citoesqueleto permitiendo el consecuente movimiento celular mejorando su capacidad migratoria. Una vez las células han migrado, empiezan a proliferar en la zona dañada del músculo. Al ser un efecto más tardío, podría ser la explicación de porqué la inhibición de la vía de RhoA no bloquea directamente la proliferación celular.



**Figura 37. Señalización de PDGF-AA.** El PDGF-AA activa diferentes vías de señalización (entre ellas, MAPK, PKC o PI3K), la mayoría de ellas implicadas con la proliferación celular y la transcripción de genes involucrados en distintos procesos, como la adhesión celular o movimiento. La vía de RhoA promueve la reorganización inmediata de actina, lo que conlleva a la migración celular como primera respuesta.

La estimulación con PDGF-AA causó un aumento significativo de la migración a las 48 y 72 horas mientras que el pre-tratamiento con los 2 inhibidores bloqueó este efecto de forma significativa. Finalmente, el tratamiento con inhibidores previo a la estimulación con PDGF-AA disminuyó significativamente la secreción de colágeno al compararlo con el tratamiento de PDGF-AA solo. Sin embargo, los fibroblastos tratados con PDGF-AA aumentaron esta secreción comparándolos con los no tratados pero sin cambios significativos.

Aunque la vía de RhoA promueve la expresión de proteínas de la ECM, la inducción mediante PDGF-AA parece no tener un gran efecto en la expresión de colágeno, algo ya observado previamente (230,231). En cambio, otros factores como el TGF- $\beta$  han mostrado aumento significativo de colágeno I y III y una disminución de estas proteínas al añadir el pretratamiento con fasudil (232). Por tanto, todo parece indicar que PDGF-AA podría estimular la producción de proteínas de la ECM pero de forma menos abundante que TGF- $\beta$ .

Hemos podido demostrar que PDGF-AA modula la vía de RhoA en fibroblastos derivados de pacientes DMD y que el uso de inhibidores de esta vía podría ser efectivo disminuyendo la activación de fibroblastos. El efecto de la inhibición de la vía de RhoA *in vivo* podría tener un mayor efecto retrasando la progresión de la fibrosis muscular debido a que otros factores de crecimiento altamente implicados en la fibrosis, como el TGF- $\beta$ , también activan la vía de RhoA (245,246).

Aparte de los efectos que tiene PDGF-AA en el proceso fibrótico, TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB y CTGF también se han estudiado en la fibrosis muscular. Debido a que el proceso fibrótico es una característica común de las distrofias musculares, quisimos estudiar el comportamiento de los 4 factores en suero de las distrofinopatías, LGMD-R2 y enfermedad de Pompe. Aunque en la enfermedad de Pompe el proceso de degeneración, inflamación y fibrosis muscular no es tan evidente como en las distrofias, estudios radiológicos muestran que el tejido muscular se pierde gradualmente y se substituye por tejido graso, proceso que también ocurre en las distrofias musculares (247,248).

En el caso de la enfermedad de Pompe encontramos que todos los factores analizados presentaron diferencias significativas respecto al grupo control. Sin embargo, solo los niveles de PDGF-BB presentaban diferencias significativas cuando comparábamos pacientes asintomáticos con sintomáticos. De hecho, pudimos determinar que a 1.97 ng/ml era la concentración de PDGF-BB a partir de la cual los pacientes se diferenciaban entre sintomáticos y asintomáticos.

El PDGF-BB es un factor que se ha relacionado con procesos fibróticos a la vez que regenerativos (109-111). El hecho que PDGF-BB presentase una concentración sanguínea más baja en pacientes Pompe comparados con controles sanos y que en pacientes sintomáticos estuviese más bajo que en asintomáticos, sugiere una posible relación con la progresión de la enfermedad y liga con la supuesta alteración en el proceso regenerativo muscular descrito previamente en pacientes Pompe (76),(99),(237). En nuestra opinión, el proceso degenerativo muscular que tiene lugar en la enfermedad de Pompe es diferente al que tiene lugar en las distrofias musculares, lo que podría explicar por qué los pacientes con enfermedad de Pompe tienen niveles más bajos en sangre de PDGF-BB. En las distrofias musculares el daño muscular está asociado con la inestabilidad de la membrana muscular que induce la liberación de citoquinas para promover el reclutamiento de células inflamatorias y la activación de SC (238). Se ha descrito previamente que PDGF-BB se libera en el músculo por las fibras musculares necróticas, las fibras regenerativas y las células inflamatorias. PDGF-BB se ha relacionado con la proliferación y migración de las células satélite, por lo que parece tener un papel importante la regeneración muscular. No se conoce con exactitud el proceso que lleva a la muerte de las fibras musculares en la enfermedad de Pompe. Sabemos que el glucógeno se acumula progresivamente en los lisosomas produciendo su ruptura y liberación de enzimas líticas al sarcoplasma, posiblemente dañando la fibras musculares, pero a diferencia de lo que ocurre en las distrofias musculares, no existe una rotura de la membrana muscular que lleve a la producción de citoquinas inflamatorias, reclutando células inflamatorias y activando la proliferación de las SC. El proceso regenerativo muscular es deficiente, existiendo apenas algunas fibras regenerantes (251,252). Por tanto, la respuesta local es muy diferente en la enfermedad de Pompe que en las distrofias musculares.

El PDGF-BB podría ser útil para identificar aquellos pacientes en los que el proceso de degeneración muscular ha empezado pero sin todavía afectar la función muscular. De ser así monitorizar los niveles de PDGF-BB en sangre de forma periódica en pacientes

presintomáticos podría ser de utilidad de cara a iniciar la ERT, ya que ésta se administra únicamente a pacientes con debilidad muscular o respiratoria. Sin embargo, los pacientes pueden desarrollar alteraciones motoras leves, que no son evidentes a la hora de realizar pruebas funcionales.

Por otro lado, comparamos los niveles de TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB, PDGF-AA y CTGF en las distrofias musculares y obtuvimos distintos perfiles de expresión.

En el caso de la DMD obtuvimos diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos PDGF-AA con los controles jóvenes sanos. Además, los niveles de PDGF-AA presentaron una correlación significativamente estadística con distintas pruebas de función y fuerza muscular. El hecho de no encontrar diferencias estadísticas con los demás factores de crecimiento podría ser debido a que la mayoría de pacientes de la cohorte DMD se encontraban bajo tratamiento de corticoides. La terapia con corticoides podría influir en la expresión de factores relacionados con la fibrosis ya que estos fármacos reducen la inflamación (169). En la cohorte de BMD observamos que los niveles de CTGF y PDGF-BB estaban aumentados significativamente comparado con el grupo control y que los niveles de PDGF-AA correlacionaba con las pruebas de función, fuerza, habilidad muscular, resultados de espirometría y la cuantificación de la fracción grasa en muslos. Finalmente, en el grupo de LGMD-R2 observamos que CTGF estaba aumentado significativamente comparándolo con el grupo control mientras que TGF- $\beta$ 1 se encontraba disminuido comparándolo con el grupo control y con las distrofinopatías. En este caso, no encontramos ninguna correlación estadísticamente significativa. Aunque el número de muestras es muy pequeño, observamos diferencias importantes en los perfiles de expresión de los 4 factores de crecimiento según la distrofia analizada. La diferencia más característica es la baja expresión de TGF- $\beta$ 1 en la LGMD-R2 y la falta de correlación con ninguno de los factores estudiados. Las disferlinopatías, a pesar de compartir mecanismos fisiopatológicos comunes a otras distrofias musculares como la DMD y BMD, se caracterizan por ser de progresión lenta, algo que implica varias

diferencias respecto otras distrofias. Una de las principales diferencias es el modelo de afectación muscular (190). La LGMD-R2 no presenta afectación cardíaca ni respiratoria, mientras que en las distrofinopatías es una característica común. Otra de las diferencias radica en los resultados obtenidos en modelos murinos tratados con antifibróticos mediante la inhibición de TGF- $\beta$ 1. Mientras el losartan y la folistatina reduce la fibrosis en distrofinopatías (173), en la LGMD-R2 produce el efecto contrario (174),(177). Además, el tratamiento con corticoides produce un efecto negativo en la LGMD-R2, mientras que en las distrofinopatías es el único tratamiento establecido (241). Estas diferencias podrían indicar que a pesar de compartir mecanismos fisiopatológicos, los factores moleculares que afectan a la degeneración muscular deben ser diferentes según la distrofia.

Hemos podido observar que en la enfermedad de Pompe, PDGF-BB podría ser útil para el seguimiento de pacientes asintomáticos y que su perfil de expresión en estos pacientes concordaría con la baja tasa regenerativa de las fibras musculares. Por otro lado, el factor profibrótico PDGF-AA podría ser útil como biomarcador en distrofinopatías, debido a su alta correlación con distintas pruebas funcionales. Sin embargo, no hemos podido encontrar ningún factor de crecimiento con posible utilidad como biomarcador para la LGMD-R2. Quizás factores implicados con el proceso inflamatorio podrían presentar una mejor correlación con la progresión de la enfermedad en la LGMD-R2, ya que se ha demostrado que los niveles TSP-1 diferencian entre pacientes ambulantes y no ambulantes (82).

Por tanto, a pesar de compartir mecanismos fisiopatológicos no podemos generalizar a la hora de buscar biomarcadores ya que cada patología muestra perfiles de expresión distintos. La dinámica molecular durante los procesos de regeneración, inflamación y fibrosis es bastante compleja y depende en gran medida del daño local producido. Aunque las proteínas tengan función similar presentan una regulación diferente y tanto su mecanismo de acción como la velocidad a la que se liberan no tienen por qué ser igual entre ellas.



## **7. CONCLUSIONES**



Del trabajo realizado en esta tesis se pueden concluir varios puntos:

1. El tratamiento con inhibidores de proteasoma y análogo de la Vitamina D3 no tiene un efecto directo en el aumento de expresión de disferlina, pero disminuye los niveles de TSP-1 *in vitro* liberado por los mioblastos procedentes de un paciente con LGMD-R2. Por tanto, estos tratamientos podrían reducir la inflamación en pacientes con LGMD-R2.
2. La molécula PDGF-AA promueve la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos a través de la vía de RhoA promoviendo el aumento de F-actina, la migración y proliferación celular. La inhibición de esta vía podría ser de utilidad para enlentecer el proceso fibrótico en pacientes con distrofias musculares.
3. Los niveles serológicos de PDGF-BB en pacientes con la enfermedad de Pompe podrían ser útiles para identificar pacientes asintomáticos en los que se ha iniciado el proceso de degeneración muscular, pero la función muscular está preservada. Esto ayudaría a determinar el inicio del tratamiento. Los resultados obtenidos de este trabajo se publicaron en la revista *Scientific Reports* (artículo adjunto en el apartado Anexo).
4. La concentración sanguínea de PDGF-AA podría ser buen biomarcador de progresión en distrofinopatías ya que hemos evidenciado una correlación positiva con varias pruebas de función y habilidad muscular en pacientes con DMD y BMD.



## 8. LÍNEAS DE FUTURO



Los resultados obtenidos en esta tesis han servido para desarrollar varias líneas de trabajo que actualmente están en marcha:

1. En primer lugar, la obtención de modelos celulares de disferlinopatías con mutaciones concretas. Existen variantes de significado incierto en numerosos genes. Estas variantes no permiten confirmar que la mutación es realmente la causa de la enfermedad en un paciente. Por este motivo, el uso de técnicas CRISPR-Cas para introducir mutaciones concretas en el gen de la disferlina en líneas celulares y obtener, de este modo, un modelo celular de disferlinopatía presenta gran utilidad para estudiar el efecto de dicha mutación en la fisiología muscular y conocer si la mutación es patogénica o no. Además, el desarrollo de modelos celulares de déficit de disferlina puede ser de utilidad para el cribaje de fármacos que mejoren estas funciones y para evaluar la patogenicidad de mutaciones de significado incierto.
2. Estudiar el efecto de fasudil en un modelo murino de DMD. Debido a los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* con los inhibidores de la vía de RhoA, queremos analizar el efecto del inhibidor que ha mostrado efecto terapéutico en otras enfermedades (fasudil) en un modelo murino de DMD. Para ello, utilizaremos el modelo murino D2-*mdx* ya que presenta una acumulación de tejido fibroso mayor que la del ratón *mdx*.
3. Identificar los mecanismos celulares involucrados en la degeneración muscular de diferentes miopatías hereditarias. Se han identificado distintas poblaciones celulares implicadas en el mecanismo de degeneración. Entre ellas, las subpoblaciones de FAPs tienen un papel importante en la expansión del tejido fibrótico y adipogénico. Para ello, se analizarán biopsias de músculo esquelético de pacientes con distintas miopatías en diferentes estadios clínicos utilizando la citometría de masas. Esta tecnología nos permite analizar hasta 40 marcadores simultáneamente en el músculo esquelético para establecer las interacciones entre las células FAP y el resto de componentes del músculo

esquelético. El análisis de las subpoblaciones de FAPs así como de las distintas células presentes en el músculo esquelético ayudará a entender el proceso implicado en la degeneración muscular según la patología y según el estadio clínico de la enfermedad.

4. Caracterizar la función biológica y el potencial fibrogénico y adipogénico de células FAP obtenidas de biopsias musculares de controles sanos y pacientes con distrofias musculares. Una vez caracterizados podremos analizar el efecto de las FAPs en fibroblastos, macrófagos y SC *in vitro* mediante co-cultivos celulares.

## 9. BIBLIOGRAFIA



1. Claeys KG. Congenital myopathies: an update. *Dev Med Child Neurol.* 2019; 62(3):297-302.
2. Cassandrini D, Trovato R, Rubegni A, Lenzi S, Fiorillo C, Baldacci J, et al. Congenital myopathies: Clinical phenotypes and new diagnostic tools. *Ital J Pediatr.* 2017 Nov 15;43(1).
3. Mercuri E, Bönnemann CG, Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet.* 2019; 394(10213): 2025–2038.
4. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010; 9(1):77–93.
5. Birnkrant J, John Dystrophy WM, Bann M, Birnkrant DJ, Bushby K, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol.* 2018;17(18):347–61.
6. Pandey SN, Kesari A, Kesari A, Yokota T, Pandey GS. Muscular dystrophy: Disease mechanisms and therapies. *Biomed Res Int.* 2015; 453648.
7. Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, Kusaka K, Nishino H. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain.* 1986;109 (1):31–54.
8. Straub V, Murphy A, Udd B. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies; Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17-19 March 2017. *Neuromuscul Disord.* 2018; 28(8):702-710
9. Dubowitz, Victor; Oldfors, Anders; Sewry, Caroline A. *Muscle Biopsy: A Practical Approach: Expert Consult.* Elsevier Health Sciences, 2013.
10. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial

- deletions of the DMD locus. *Genomics*. 1988;2(1):90–5.
11. Flanigan KM. Duchenne and becker muscular dystrophies. *Neurol. Clin.* 2014; 32(2): 671–88.
  12. Ke Q, Zhao ZY, Griggs R, Wiley V, Connolly A, Kwon J, et al. Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy in China: follow-up diagnosis and subsequent treatment. *World J. of Pediatr.* 2017; 13(3):197–201.
  13. Darras BT, Urion DK, Ghosh PS. Dystrophinopathies. *GeneReviews®*; 1993
  14. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Review Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010; 9(1): 77-93.
  15. Kang PB. Beyond the Gowers sign: measuring outcomes in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 2013; 48(3):315–7.
  16. Li H, Mittal A, Makonchuk DY, Bhatnagar S, Kumar A. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2009;18(14):2584–98.
  17. Mayer OH, Finkel RS, Rummey C, Benton MJ, Glanzman AM, Flickinger J, et al. Characterization of pulmonary function in Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatr Pulmonol.* 2015 May 1;50(5):487–94.
  18. Martínez Carrasco C, Villa Asensi JR, Luna Paredes MC, Osona Rodríguez De Torres FB, Peña Zarza JA, Larramona Carrera H, et al. Enfermedad neuromuscular: evaluación clínica y seguimiento desde el punto de vista neumológico. *An Pediatr.* 2014;81(4):258.e1-258.e17.
  19. Love DR, Forrest SM, Smith TJ, England S, Flint T, Davies KE. Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Br Med Bull.* 1989; 45(3): 659-680.
  20. Flanigan KM, Dunn DM, Von Niederhausern A, Soltanzadeh P, Gappmaier E, Howard MT, et al. Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy

- patients: Application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat.* 2009;30(12):1657–1666.
21. Nicholson L V, Johnson MA, Bushby KM, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar IB, et al. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 1. Trends across the clinical groups. *J Med Genet.* 1993;30(9):728–36.
  22. Young HK, Barton BA, Waisbren S, Portales Dale L, Ryan MM, Webster RI, et al. Cognitive and psychological profile of males with Becker muscular dystrophy. *J Child Neurol.* 2008;23(2):155–162.
  23. Tuffery-Giraud S, Béroud C, Leturcq F, Yaou R Ben, Hamroun D, Michel-Calemard L, et al. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: A model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat.* 2009;30(6):934–45.
  24. Wallace GQ, McNally EM. Mechanisms of Muscle Degeneration, Regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies. *Annu Rev Physiol.* 2009;71(1):37–57.
  25. Gao QQ, McNally EM. The dystrophin complex: Structure, function, and implications for therapy. *Compr Physiol.* 2015;5(3):1223–39.
  26. Nigro V, Savarese M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: The 2014 update. *Acta Myol.* 2014; 33(1): 1–12.
  27. Murphy AP, Straub V. The Classification, Natural History and Treatment of the Limb Girdle Muscular Dystrophies. *J Neuromuscul Dis.* 2015; 22(2): S7–19.
  28. Inashkina I, Jankevics E, Stavusis J, Vasiljeva I, Viksne K, Micule I, et al. Robust genotyping tool for autosomal recessive type of limb-girdle muscular dystrophies. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016;17(1):200.
  29. De Luna N, Gallardo E, Sonnet C, Chazaud B, Dominguez-Perles R, Suarez-Calvet X, et al. Role of Thrombospondin 1 in Macrophage Inflammation in Dysferlin Myopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69(6):643–53.
  30. Amato AA, Brown RH. Dysferlinopathies. *Handb Clin Neurol.* 2011; 101:111–8.

31. Urtizberea Ja, Bassez G, Leturcq F, Nguyen K, Krahn M, Levy N. Dysferlinopathies. *Neurol India*. 2008; 56(3):289.
32. Paradas C, Llauger J, Diaz-Manera J, Rojas-García R, De Luna N, Iturriaga C, et al. Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology*. 2010 Jul 27;75(4):316–23.
33. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1998;20(1):31–6.
34. Peulen, Rademaker, Anania, Turtoi, Bellahcène, Castronovo. Ferlin Overview: From Membrane to Cancer Biology. *Cells*. 2019 Aug 22;8(9):954.
35. Flix B, Suárez-Calvet X, Díaz-Manera J, Santos-Nogueira E, Mancuso R, Barquinero J, et al. Bone marrow transplantation in dysferlin-deficient mice results in a mild functional improvement. *Stem Cells Dev*. 2013;22(21):2885–2894.
36. Therrien C, Di Fulvio S, Pickles S, Sinnreich M. Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. *Biochemistry*. 2009;48(11):2377–2384.
37. Han R, Campbell KP. Dysferlin and muscle membrane repair. *Curr Opin Cell Biol*. 2007; 19(4): 409–416.
38. Kerr JP, Ward CW, Bloch RJ. Dysferlin at transverse tubules regulates Ca(2+) homeostasis in skeletal muscle. *Front Physiol*. 2014;5:89.
39. de Luna N, Gallardo E, Soriano M, Dominguez-Perles R, de la Torre C, Rojas-García R, et al. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation “in vitro”. *J Biol Chem*. 2006; 281(25):17092–8.
40. Tarnopolsky MA. Metabolic Myopathies. *Musc Neuromusc Junct Dis*. 2016; 22(6): 1829–1851.
41. Lilleker JB, Keh YS, Roncaroli F, Sharma R, Roberts M. Metabolic myopathies : a practical approach. *Pract Neurol*. 2018; 18(1): 14–26.

42. Toscano A, Barca E, Musumeci O. Update on diagnostics of metabolic myopathies. *Curr Opin Neurol*. 2017; 30(5):553–562.
43. Fukuda T, Roberts A, Plotz PH, Raben N. Acid alpha-glucosidase deficiency (Pompe disease). *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2007; 7(1):71–77.
44. DeRuisseau LR, Fuller DD, Qiu K, DeRuisseau KC, Donnelly WH, Mah C, et al. Neural deficits contribute to respiratory insufficiency in Pompe disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 9;106(23):9419–9424.
45. Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurotherapeutics*. 2018;15(4):928–942.
46. Bembi B, Cerini E, Danesino C, Donati MA. Diagnosis of glycogenosis type II. *Neurology*. 2008; 71(23): S4-11.
47. 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*. 2008; 38(4):1236–45.
48. Filosto M, Cotelli MS, Vielmi V, Todeschini A, Rinaldi F, Rota S, et al. Late-Onset Glycogen Storage Disease Type 2. *Curr Mol Med*. 2014;14(8):971–978.
49. Peruzzo P, Pavan E, Dardis A. Molecular genetics of Pompe disease: a comprehensive overview. *Ann Transl Med*. 2019;7(13):278–278.
50. Nakagama Y, Hamanaka K, Mimaki M, Shintaku H, Miyatake S, Matsumoto N, et al. Leaky splicing variant in sepiapterin reductase deficiency: Are milder cases escaping diagnosis? *Neurol Genet*. 2019;5(2): e319.
51. Raben N, Nichols RC, Martiniuk F, Plotz PH. A model of mRNA splicing in adult lysosomal storage disease (glycogenosis type II). *Hum Mol Genet*. 1996; 5(7):995–1000.
52. Dardis A, Zanin I, Zampieri S, Stuanı C, Pianta A, Romanello M, et al. Functional characterization of the common c.-32-13T>G mutation of GAA gene: Identification of potential therapeutic agents. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(2):1291–302.

53. McVie-Wylie AJ, Lee KL, Qiu H, Jin X, Do H, Gotschall R, et al. Biochemical and pharmacological characterization of different recombinant acid  $\alpha$ -glucosidase preparations evaluated for the treatment of Pompe disease. *Mol Genet Metab.* 2008; 94(4):448–55.
54. Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurotherapeutics.* 2018; 15(4): 928-942.
55. Van Der Ploeg AT, Reuser AJJ. Series Lysosomal Storage Disease 2 Pompe's disease. *Acta Neurol Belg.* 2006; 106(2): 82-86
56. Ribeiro AF, Souza LS, Almeida CF, Ishiba R, Fernandes SA, Guerrieri DA, et al. Muscle satellite cells and impaired late stage regeneration in different murine models for muscular dystrophies. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 11842.
57. Yablonka-Reuveni Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell: Still Young and Fascinating at 50. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry. J Histochem Cytochem.* 2011; 59(12): 1041–1059.
58. Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Current Opinion in Genetics and Development. Curr Opin Genet Dev.* 2006; 16(5): 525–532.
59. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: Regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *Journal of Clinical Investigation. J Clin Invest.* 2010; 120(1): 11–19.
60. Pini V, Morgan JE, Muntoni F, O'Neill HC. Genome Editing and Muscle Stem Cells as a Therapeutic Tool for Muscular Dystrophies. *Curr Stem Cell Rep.* 2017; 3(2): 137–148.
61. Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* 2013; 14(12): 1062–1072.
62. Baghdadi MB, Tajbakhsh S. Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration. *Dev Biol.* 2018; 15(2): 200–209.
63. Joe AWB, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, et al. Muscle injury

- activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol.* 2010;12(2):153–63.
64. Alameddine HS, Morgan JE. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Inflammation and Fibrosis of Skeletal Muscles. *J Neuromuscul Dis.* 2016;3:455–73.
65. Xiaoping C, Yong L. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: Migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr.* 2009; 3(4): 337-341.
66. Piñol-Jurado P, Gallardo E, de Luna N, Suárez-Calvet X, Sánchez-Riera C, Fernández-Simón E, et al. Platelet-Derived Growth Factor BB Influences Muscle Regeneration in Duchenne Muscle Dystrophy. *Am J Pathol.* 2017 ;187(8):1814–1827.
67. Webster C, Blau HM. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: Implications for cell and gene therapy. *Somat Cell Mol Genet.* 1990;16(6):557–65.
68. Heslop L, Morgan JE, Partridge TA. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci.* 2000;113(12):2299–308.
69. Matecki S, Guibinga GH, Petrof BJ. Regenerative capacity of the dystrophic (mdx) diaphragm after induced injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(4): 961-968.
70. Ishimoto S, Goto I, Ohta M, Kuroiwa Y. A quantitative study of the muscle satellite cells in various neuromuscular disorders. *J Neurol Sci.* 1983;62(1–3):303–14.
71. Wakayama Y, Schotland DL, Bonilla E, Orecchio E. Quantitative ultrastructural study of muscle satellite cells in Duchenne dystrophy. *Neurology.* 1979; 29(3):401–7.
72. Jasmin G, Tautu C, Vanasse M, Brochu P, Simoneau R. Impaired muscle differentiation in explant cultures of Duchenne muscular dystrophy. *Lab Investig.*

- 1984;50(2):197–207.
73. Delaporte C, Dehaupas M, Fardeau M. Comparison between the growth pattern of cell cultures from normal and Duchenne dystrophy muscle. *J Neurol Sci.* 1984;64(2):149–60.
  74. Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med.* 2007;13(2):204–10.
  75. Dumont NA, Wang YX, Von Maltzahn J, Pasut A, Florian Bentzinger C, Brun CE, et al. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med.* 2015;21(12):1455–63.
  76. Schaaf GJ, Van Gestel TJ, Brusse E, Verdijk RM, Fm De Coo I, Van Doorn PA, et al. Lack of robust satellite cell activation and muscle regeneration during the progression of Pompe disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2015; 28(3): 65.
  77. Schaaf GJ, Canibano-Fraile R, Van Gestel TJM, Van Der Ploeg AT, Pim Pijnappel WWM, Pim Pijnappel ; W W M. Restoring the regenerative balance in neuromuscular disorders: satellite cell activation as therapeutic target in Pompe disease. *Ann Transl Med.* 2019; 7(13): 280.
  78. Duchesne E, Dufresne SS, Dumont NA. Impact of Inflammation and Anti-inflammatory Modalities on Skeletal Muscle Healing: From Fundamental Research to the Clinic . *Phys Ther.* 2017; 98(8): 807-817.
  79. Rawat R, Cohen T V., Ampong B, Francia D, Henriques-Pons A, Hoffman EP, et al. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. *Am J Pathol.* 2010;176(6):2891–2900.
  80. Henriques-Pons A, Yu Q, Rayavarapu S, Cohen T V., Ampong B, Cha HJ, et al. Role of toll-like receptors in the pathogenesis of dystrophin-deficient skeletal and heart muscle. *Hum Mol Genet.* 2014;23(10):2604–2617.
  81. Li Y, Qi X, Tong X, Wang S. Thrombospondin 1 activates the macrophage Toll-like receptor 4 pathway. *Cell Mol Immunol.* 2013;10(6):506–5012.

82. Urao N, Mirza RE, Corbiere TF, Hollander Z, Borchers CH, Koh TJ. Thrombospondin-1 and disease progression in dysferlinopathy. *Hum Mol Genet* . 2017;26(24):4951–4960.
83. Urao N, Mirza RE, Heydemann A, Garcia J, Koh TJ. Thrombospondin-1 levels correlate with macrophage activity and disease progression in dysferlin deficient mice. *Neuromuscul Disord*. 2016;26(3):240–51.
84. Perandini LA, Chimin P, Lutkemeyer D da S, Câmara NOS. Chronic inflammation in skeletal muscle impairs satellite cells function during regeneration: can physical exercise restore the satellite cell niche? *FEBS J* . 2018;285(11):1973–84.
85. Maffioletti SM, Noviello M, English K, Tedesco FS. Stem Cell Transplantation for Muscular Dystrophy: The Challenge of Immune Response. *Biomed Res Int*. 2014;2014:946010.
86. Li YP. TNF- $\alpha$  is a mitogen in skeletal muscle. *Am J Cell Physiol*. 2003; 285(2): 370-376.
87. Chen SE, Jin B, Li YP. TNF- $\alpha$  regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Cell Physiol*. 200; 292(5): 1660-1671.
88. Otis JS, Niccoli S, Hawdon N, Sarvas JL, Frye MA, Chicco AJ, et al. Pro-inflammatory mediation of myoblast proliferation. *PLoS One* . 2014;9(3):e92363.
89. Rosenberg AS, Puig M, Nagaraju K, Hoffman EP, Villalta SA, Rao VA, et al. Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med*. 2015; 5(7): 299.
90. Giordano C, Mojumdar K, Liang F, Lemaire C, Li T, Richardson J, et al. Toll-like receptor 4 ablation in mdx mice reveals innate immunity as a therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(8):2147–2162.
91. Welc SS, Clanton TL. The regulation of interleukin-6 implicates skeletal muscle as an integrative stress sensor and endocrine organ. *Exp Physiol*. 2013;98(2):359–371.

92. Del Rocío Cruz-Guzmán O, Rodríguez-Cruz M, Elena R, Cedillo E. Systemic Inflammation in Duchenne Muscular Dystrophy: Association with Muscle Function and Nutritional Status. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 891972.
93. Klingler W, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Schleip R. The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol myopathies cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol*. 2012; 31(3):184–195.
94. Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Fibrosis development in early-onset muscular dystrophies: Mechanisms and translational implications. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; 64: 181-190.
95. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. *Front Pharmacol*. 2014;27(5):1–13.
96. Kang X, Yang M, Shi Y, Xie M, Zhu M, Zheng X, et al. Interleukin-15 facilitates muscle regeneration through modulation of fibro/adipogenic progenitors. *Cell Commun Signal*. 2018; 16(1):42.
97. Forcina L, Miano C, Scicchitano B, Musarò A. Signals from the Niche: Insights into the Role of IGF-1 and IL-6 in Modulating Skeletal Muscle Fibrosis. *Cells*. 2019; 8(3):232.
98. Zou Y, Zhang R-Z, Sabatelli P, Chu M-L, Bönnemann CG, Logar A, et al. Muscle interstitial fibroblasts are the main source of collagen VI synthesis in skeletal muscle: implications for congenital muscular dystrophy types Ullrich and Bethlem. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008; 67(2):144–154.
99. 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):1208–1220.
100. Kulesa M, Weyer-Menkoff I, Viergutz L, Kornblum C, Claeys KG, Schneider I, et al. An integrative correlation of myopathology, phenotype and genotype in late onset Pompe disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2019; 10;1111.
101. Kim J, Lee J. Role of transforming growth factor- $\beta$  in muscle damage and

- regeneration: focused on eccentric muscle contraction. *J Exerc Rehabil* . 2017;13(6):621–626.
102. Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL, et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. Vol. 1, *Skeletal Muscle*. 2011.
  103. Kharraz Y, Guerra J, Pessina P, Serrano AL, Muñoz-Canoves P. Understanding the process of fibrosis in duchenne muscular dystrophy. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 965631.
  104. Papadopoulos N, Lennartsson J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Mol Aspects Med*. 2018; 62: 75-88.
  105. Hoch R V., Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development*. 2003; 130(20): 4769–4784.
  106. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(4):255–73.
  107. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008; 22(10): 1276–1312.
  108. Zhao Y, Haginoya K, Sun G, Dai H, Onuma A, Inuma K. Platelet-derived growth factor and its receptors are related to the progression of human muscular dystrophy: an immunohistochemical study. *J Pathol*. 2003; 201(1):149–159.
  109. Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda Ichi, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol*. 2010;12(2): 143-152.
  110. Olson LE, Soriano P. Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell* . 2009;16(2):303–313.
  111. Huang P, Zhao XS, Fields M, Ransohoff RM, Zhou L. Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice. *FASEB J*. 2009 Aug;23(8):2539–2548.
  112. Wang C, Liu Y, He D. Diverse effects of platelet-derived growth factor-BB on cell signaling pathways. *Cytokine*. 2019;113:13–20.

113. Piñol-Jurado P, Gallardo E, de Luna N, Suárez-Calvet X, Sánchez-Riera C, Fernández-Simón E, et al. Platelet-Derived Growth Factor BB Influences Muscle Regeneration in Duchenne Muscle Dystrophy. *Am J Pathol.* 2017;187(8).
114. Jin P, Sejersen T, Ringertz NR. Recombinant platelet-derived growth factor-BB stimulates growth and inhibits differentiation of rat L6 myoblasts. *J Biol Chem.* 1991;266(2):1245–1249.
115. Partridge T. Disciplining the stem cell into myogenesis. *N Engl J Med.* 2006;354(17):1844–1855.
116. Seto JT, Bengtsson NE, Chamberlain JS. Therapy of Genetic Disorders: Novel Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr Pediatr Rep.* 2014;2(2):102–112.
117. Anderson LVB, Wrogemann K, Roy B, Goulet M, Tremblay JP. Dysferlin expression after normal myoblast transplantation in SCID and in SJL mice. *2002;12:167–73.*
118. Hotta A. Genome Editing Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* 2015; 22;2(4): 343–355.
119. Maggio I, Chen X, Gonçalves MAF V. The emerging role of viral vectors as vehicles for DMD gene editing. *Genome Med* 2016;8(1):59.
120. Van Putten M, Hulsker M, Young C, Nadarajah VD, Heemskerk H, Van Der Weerd L, et al. Low dystrophin levels increase survival and improve muscle pathology and function in dystrophin/utrophin double-knockout mice. *FASEB J.* 2013;27(6):2484–2495.
121. Barthélémy F, Wein N, Krahn M, Lévy N, Bartoli M. Translational research and therapeutic perspectives in dysferlinopathies. *Mol Med.* 2011;17(9-10): 875–882.
122. Krahn M, Wein N, Bartoli M, Lostal W, Courrier S, Bourg-Alibert N, et al. A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Sci Transl Med.* 2010;2(50):50ra69-50ra69.
123. Byrne BJ, Falk DJ, Clé N, Mah CS. Gene Therapy Approaches for Lysosomal

- Storage Disease: Next-Generation Treatment. *Hum Gene Ther.* 2012; 23(8):808-815.
124. Penati R, Fumagalli F, Calbi V, Bernardo ME, Aiuti A. Gene therapy for lysosomal storage disorders: recent advances for metachromatic leukodystrophy and mucopolysaccharidosis I. *J. Inherit Metab Dis.* 2017;40(4): 543–554.
  125. Do H V, Khanna R, Gotschall R. Challenges in treating Pompe disease: an industry perspective. *Ann Transl Med.* 2019;7(13):291.
  126. Bond JE, Kishnani PS, Koeberl DD. Immunomodulatory, liver depot gene therapy for Pompe disease. *Cell Immunol.* 2019;342:103737.
  127. Salabarria SM, Nair J, Clement N, Smith BK, Raben N, Fuller DD, et al. Advancements in AAV-mediated Gene Therapy for Pompe Disease. *J Neuromuscul Dis.* 2020; 7(1):15–31.
  128. Byrne BJ, Fuller DD, Smith BK, Clement N, Coleman K, Cleaver B, et al. Pompe disease gene therapy: neural manifestations require consideration of CNS directed therapy. *Ann Transl Med.* 2019;7(13):290.
  129. Kishnani PS, Sun B, Koeberl DD. Gene therapy for glycogen storage diseases. *Hum Mol Genet.* 2019; 28(1): 31-41.
  130. Cai A, Kong X. Development of CRISPR-Mediated Systems in the Study of Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum Gene Ther Methods.* 2019;30(3):71–80.
  131. Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science (80- ).* 2016;351(6271):400–403.
  132. Turan S, Farruggio AP, Srifa W, Day JW, Calos MP. Precise Correction of Disease Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells Derived From Patients With Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Mol Ther.* 2016; 24(4): 685-696.
  133. van der Wal E, Herrero-Hernandez P, Wan R, Broeders M, in 't Groen SLM, van Gestel TJM, et al. Large-Scale Expansion of Human iPSC-Derived Skeletal Muscle Cells for Disease Modeling and Cell-Based Therapeutic Strategies. *Stem*

- Cell Reports. 2018;10(6):1975–1990.
134. Rowel K, Lim Q, Echigoya Y, Nagata T, Kuraoka M, Kobayashi M, et al. Efficacy of Multi-exon Skipping Treatment in Duchenne Muscular Dystrophy Dog Model Neonates. *Mol.* 2019;27:76–86.
  135. Roshmi RR, Yokota T. Viltolarsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drugs of Today.* 2019;55(10):627–39.
  136. Heo YA. Golodirsen: First Approval. Vol. 80, *Drugs.* Adis; 2020. p. 329–333.
  137. Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: An open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet.* 2011;378(9791):595–605.
  138. Echigoya Y, Lim KRQ, Nakamura A, Yokota T. Multiple exon skipping in the duchenne muscular dystrophy hot spots: Prospects and challenges. *J of Pers Med.* 2018; 8(4): 41.
  139. Goyenvalle A, Griffith G, Babbs A, Andaloussi S El, Ezzat K, Avril A, et al. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat Med.* 2015;21(3):270–275.
  140. Lim KRQ, Maruyama R, Yokota T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther.* 2017; 11:533–545.
  141. Wein N, Avril A, Bartoli M, Beley C, Chaouch S, Laforêt P, et al. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum Mutat.* 2010;31(2):136–142.
  142. Aartsma-Rus A, Singh KHK, Fokkema IFAC, Ginjaar IB, Van Ommen GJ, Dunnen JTD, et al. Therapeutic exon skipping for dysferlinopathies. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(8):889–894.
  143. Schairer D, Martinez LR, Blecher K, Chouake J, Nacharaju P, Gialanella P, et al. Nitric oxide nanoparticles: Pre-clinical utility as a therapeutic for intramuscular abscesses. *Virulence.* 2012;3(1):62–67.

144. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm*; 2011; 8(6): 2101–2141.
145. Finkel RS, Flanigan KM, Wong B, Bönnemann C, Sampson J, Sweeney HL, et al. Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. 2013; 11;8(12): e81302.
146. Haas M, Vlcek V, Balabanov P, Salmonson T, Bakchine S, Markey G, et al. European medicines agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord*. 2015;25(1):5–13.
147. Wang B, Yang Z, Brisson BK, Feng H, Zhang Z, Welch EM, et al. Membrane blebbing as an assessment of functional rescue of dysferlin-deficient human myotubes via nonsense suppression. *J Appl Physiol*. 2010;109(3):901–905.
148. Kleopa KA, Drousiotou A, Mavrikiou E, Ormiston A, Kyriakides T. Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2006; 15(10): 1623-1628.
149. Guiraud S, Roblin D, Kay DE. The potential of utrophin modulators for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2018;6(3):179–192.
150. Teicher BA, Tomaszewski JE. Proteasome inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 2015;96(1):1–9.
151. Sandri M, Coletto L, Grumati P, Bonaldo P. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J Cell Sci*. 2013;126(23):5325–533.
152. Assereto S, Stringara S, Sotgia F, Bonuccelli G, Broccolini A, Pedemonte M, et al. Pharmacological rescue of the dystrophin-glycoprotein complex in Duchenne and Becker skeletal muscle explants by proteasome inhibitor treatment. *Am J*

- Physiol Physiol. 2006; 290(2):577–582.
153. Gazzero E, Assereto S, Bonetto A, Sotgia F, Scarfi S, Pistorio A, et al. Therapeutic potential of proteasome inhibition in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Am J Pathol.* 2010;176(4):1863–1877.
  154. De Luna N, Díaz-Manera J, Paradas C, Iturriaga C, Rojas-García R, Araque J, et al.  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ - Vitamin D3 increases dysferlin expression in vitro and in a human clinical trial. *Mol Ther.* 2012;20(10):1988–1997.
  155. Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, et al. Recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase: Major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology.* 2007;68(2):99–109.
  156. 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.
  157. Van Der Ploeg AT, B. Loonen MC, Bolhuis PA, Busch HMF, Reuser AJJ, Galjaard H. Receptor-mediated uptake of acid  $\alpha$ -glucosidase corrects lysosomal glycogen storage in cultured skeletal muscle. *Pediatr Res.* 1988;24(1):90–94.
  158. Xu S, Lun Y, Frascella M, Garcia A, Soska R, Nair A, et al. Improved efficacy of a next-generation ERT in murine Pompe disease. *JCI insight.* 2019;4(5):125358.
  159. Banugaria SG, Prater SN, Ng YK, Kobori JA, Finkel RS, Ladda RL, et al. The impact of antibodies on clinical outcomes in diseases treated with therapeutic protein: Lessons learned from infantile Pompe disease. *Genet Med.* 2011;13(8):729–736.
  160. Kazi ZB, Desai AK, Berrier KL, Troxler RB, Wang RY, Abdul-Rahman OA, et al. Sustained immune tolerance induction in enzyme replacement therapy-treated CRIM-negative patients with infantile Pompe disease. *JCI insight.* 2017;2(16).
  161. Poelman E, Hoogeveen-Westerveld M, Kroos-De Haan MA, Van Den Hout JMP, Bronsema KJ, Van De Merbel NC, et al. High Sustained Antibody Titers in

- Patients with Classic Infantile Pompe Disease Following Immunomodulation at Start of Enzyme Replacement Therapy. *J Pediatr.* 2018; 195:236-243.
162. Fernández-Simón E, Carrasco-Rozas A, Gallardo E, González-Quereda L, Alonso-Pérez J, Belmonte I, et al. Study of the effect of anti-rhGAA antibodies at low and intermediate titers in late onset Pompe patients treated with ERT. *Mol Genet Metab.* 2019; 128(1-2): 129-136.
  163. Zhu Y, Jiang JL, Gumlaw NK, Zhang J, Bercury SD, Ziegler RJ, et al. Glycoengineered acid  $\alpha$ -glucosidase with improved efficacy at correcting the metabolic aberrations and motor function deficits in a mouse model of pompe disease. *Mol Ther.* 2009;17(6):954–63.
  164. Pena LDM, Barohn RJ, Byrne BJ, Desnuelle C, Goker-Alpan O, Ladha S, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and exploratory efficacy of the novel enzyme replacement therapy avalglucosidase alfa (neoGAA) in treatment-naïve and alglucosidase alfa-treated patients with late-onset Pompe disease: A phase 1, o. *Neuromuscul Disord.* 2019;29(3):167–186.
  165. Schoser B, Bratkovic D, Byrne BJ, Clemens PR, Goker-Alpan O, Kishnani P, et al. Preliminary patient-reported outcomes and safety of advanced and targeted acid  $\alpha$ -glucosidase (AT-GAA (ATB200/AT2221) in patients with Pompe disease from the ATB200-02 trial. *Mol Genet Metab.* 2019;126(2):132–143.
  166. Gotschall R, Xu S, Lun Y, Schilling A, Soska R, Frascella M, et al. Novel recombinant human acid  $\alpha$ -glucosidase with optimal glycosylation is significantly better than standard of care enzyme replacement for glycogen clearance in skeletal muscles of GAA knock-out mice. *Mol Genet Metab.* 2015 ;114(2):S49.
  167. Escolar DM, Hache LP, Clemens PR, Cnaan A, McDonald CM, Viswanathan V, et al. Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2011;77(5):444–452.
  168. Bonifati, M. D., Ruzza, G., Bonometto, P., Berardinelli, A., Gorni, K., Orcesi, S., Lanzi, G., & Angelini, C. A Multicenter, Double-Blind, Randomized Trial of

- Deflazacort Versus Prednisone in Duchenne Muscular Dystrophy. *Muscle Nerve*. 2000;23(9):1344-1347.
169. Wehling-Henricks M, Lee JJ, Tidball JG. Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Neuromuscul Disord*. 2004;14(8–9):483–90.
170. Anderson JE, Weber M, Vargas C. Deflazacort increases laminin expression and myogenic repair, and induces early persistent functional gain in mdx mouse muscular dystrophy. *Cell Transplant*. 2000; 9(4): 551–564.
171. Mendell JR, Moxley RT, Griggs RC, Brooke MH, Fenichel GM, Miller JP, et al. Randomized, Double-Blind Six-Month Trial of Prednisone in Duchenne's Muscular Dystrophy. *N Engl J Med* . 1989;320(24):1592–1597.
172. Nemoto H, Konno S, Sugimoto H, Nakazora H, Nomoto N, Murata M, et al. Anti-TNF therapy using etanercept suppresses degenerative and inflammatory changes in skeletal muscle of older SJL/J mice. *Exp Mol Pathol*. 2011;90(3):264–270.
173. Garg K, Corona BT, Walters TJ. Losartan administration reduces fibrosis but hinders functional recovery after volumetric muscle loss injury. *J Appl Physiol* . 2014;117(10):1120–1131.
174. White Z, Milad N, Tehrani AY, Chen WWH, Donen G, Sellers SL, et al. Angiotensin II receptor blocker losartan exacerbates muscle damage and exhibits weak blood pressure-lowering activity in a dysferlin-null model of Limb-Girdle muscular dystrophy type 2B. *PLoS One*. 2019;14(8):e220903.
175. Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP, et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther*. 2015;23(1):192–201.
176. Al-Zaidy SA, Sahenk Z, Rodino-Klapac LR, Kaspar B, Mendell JR. Follistatin Gene Therapy Improves Ambulation in Becker Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2(3): 185–192.

177. Lee Y-S, Lehar A, Sebald S, Liu M, Swaggart KA, Conover C, et al. Muscle hypertrophy induced by myostatin inhibition accelerates degeneration in dysferlinopathy. *Hum Mol Genet.* 2015; 24(20): 5711-5719.
178. Huebner KD, Jassal DS, Halevy O, Pines M, Anderson JE. Functional resolution of fibrosis in mdx mouse dystrophic heart and skeletal muscle by halofuginone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(4):1550-1561.
179. Halevy O, Genin O, Barzilai-Tutsch H, Pima Y, Levi O, Moshe I, et al. Inhibition of muscle fibrosis and improvement of muscle histopathology in dysferlin knock-out mice treated with halofuginone. *Histol Histopathol.* 2013;28(2):211–226.
180. Morales MG, Gutierrez J, Cabello-Verrugio C, Cabrera D, Lipson KE, Goldschmeding R, et al. Reducing CTGF/CCN2 Slows Down Mdx Muscle Dystrophy and Improves Cell Therapy. *Hum Mol Genet.* 2013; 22(24): 4938-4951.
181. Ieronimakis N, Hays A, Prasad A, Janebodin K, Duffield JS, Reyes M. PDGFR $\alpha$  signalling promotes fibrogenic responses in collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J Pathol.* 2016;240(4):410–424.
182. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med.* 2015;21(7):786–794.
183. Piñol-Jurado P, Suárez-Calvet X, Fernández-Simón E, Gallardo E, De La Oliva N, Martínez-Muriana A, et al. Nintedanib decreases muscle fibrosis and improves muscle function in a murine model of dystrophinopathy. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):776
184. Africa S, Valley S. Skeletal muscle fibrosis : an overview. *Cell Tissue Res.* 2019; 375(3):575-588.
185. Al-Khalili Szigyarto C, Spitali P. Biomarkers of Duchenne muscular dystrophy: current findings. *Degener Neurol Neuromuscul Dis.* 2018; 8:1–13.

186. Løkken N, Hedermann G, Thomsen C, Vissing J. Contractile properties are disrupted in Becker muscular dystrophy, but not in limb girdle type 2I. *Ann Neurol*. 2016;80(3):466–471.
187. Damon BM, Li K, Dortch RD, Welch EB, Park JH, Buck AKW, et al. Quantitative magnetic resonance imaging of skeletal muscle disease. *J Vis Exp*. 2016; (118): 52352.
188. 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*. 2017; 264(10): 2053–2067.
189. Godi C, Ambrosi A, Nicastrò F, Previtali SC, Santarosa C, Napolitano S, et al. Longitudinal MRI quantification of muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016;3(8):607–622.
190. Diaz-Manera J, Fernandez-Torron R, Llauger J, James MK, Mayhew A, Smith FE, et al. Muscle MRI in patients with dysferlinopathy: Pattern recognition and implications for clinical trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 ;89(10):1071–1081.
191. Barp A, Bello L, Caumo L, Campadello P, Semplicini C, Lazzarotto A, et al. Muscle MRI and functional outcome measures in Becker muscular dystrophy. *Sci Rep*. 2017;7(1):16060.
192. Figueroa-Bonaparte S, Segovia S, Llauger J, Belmonte I, Pedrosa I, Alejaldre A, et al. Muscle MRI Findings in Childhood/Adult Onset Pompe Disease Correlate with Muscle Function. Sampaolesi M, editor. *PLoS One*. 2016;11(10):e0163493.
193. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*. 2006;20(5):515–524.
194. Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, Komaki H, Oya Y, Takeda S, et al. Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med*. 2014;19(6):452–428.

195. Carrasco-Rozas A, Fernández-Simón E, Lleixà MC, Belmonte I, Pedrosa-Hernandez I, Montiel-Morillo E, et al. Identification of serum microRNAs as potential biomarkers in Pompe disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019; 6(7):1214-1224.
196. Ozawa E, Hagiwara Y, Yoshida M. Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biochem.* 1999;190(1–2):143–151.
197. Hathout Y, Brody E, Clemens PR, Cripe L, Delisle RK, Furlong P, et al. Large-scale serum protein biomarker discovery in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(23):7153-7158.
198. Burch PM, Pogoryelova O, Goldstein R, Bennett D, Guglieri M, Straub V, et al. Muscle-Derived Proteins as Serum Biomarkers for Monitoring Disease Progression in Three Forms of Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* 2015;2(3):241–255.
199. Spitali P, Hettne K, Tsonaka R, Charrout M, van den Bergen J, Koeks Z, et al. Tracking disease progression non-invasively in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018;9(4):715–726.
200. Nadarajah VD, van Putten M, Chaouch A, Garrood P, Straub V, Lochmüller H, et al. Serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a biomarker for monitoring disease progression in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Neuromuscul Disord.* 2011;21(8):569–578.
201. Hathout Y, Seol H, Han MHJ, Zhang A, Brown KJ, Hoffman EP. Clinical utility of serum biomarkers in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Proteomics.* 2016;13(1):9.
202. Chien Y-H, Han D-S, Hwu W-L, Thurberg BL, Yang W-S. Myostatin and Insulin-Like Growth Factor I: Potential Therapeutic Biomarkers for Pompe Disease. Lucia A, editor. *PLoS One.* 2013;8(8):e71900.
203. Manwaring V, Prunty H, Bainbridge K, Burke D, Finnegan N, Franses R, et al. Urine analysis of glucose tetrasaccharide by HPLC; a useful marker for the

- investigation of patients with Pompe and other glycogen storage diseases. *J Inher Metab Dis.* 2012;35(2):311–316.
204. An Y, Young SP, Kishnani PS, Millington DS, Amalwtano A, Corzo D, et al. Glucose tetrasaccharide as a biomarker for monitoring the therapeutic response to enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Mol Genet Metab.* 2005;85:247–254.
205. Young SP, Piraud M, Goldstein JL, Zhang H, Rehder C, Laforet P, et al. Assessing disease severity in Pompe disease: The roles of a urinary glucose tetrasaccharide biomarker and imaging techniques. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2012;160(1):50–58.
206. Vandervelde L, Van den Bergh PYK, Goemans N, Thonnard JL. ACTIVLIM: A Rasch-built measure of activity limitations in children and adults with neuromuscular disorders. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(6):459–469.
207. Askanas V, Engel WK. A new program for investigating adult human skeletal muscle grown aneurally in tissue culture. *Neurology.* 1975;25(1):58–67.
208. Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, et al. Immortalized pathological human myoblasts: Towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle.* 2011;1(1):34.
209. De Luna N, Suarez-Calvet X, Garicano M, Fernandez-Simon E, Rojas-García R, Diaz-Manera J, et al. Effect of MAPK Inhibition on the Differentiation of a Rhabdomyosarcoma Cell Line Combined With CRISPR/Cas9 Technology: An In Vitro Model of Human Muscle Diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2018;77(10):964–972.
210. Malik JK, Schwarz LR, Wiebel FJ. Assessment of membrane damage in continuous cultures of mammalian cells. *Chem Biol Interact.* 1983;45(1):29–42.
211. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676–682.

212. Bonuccelli G, Sotgia F, Schubert W, Park DS, Frank PG, Woodman SE, et al. Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *Am J Pathol.* 2003;163(4):1663–1675.
213. Lu L, Qiu J, Liu S, Luo W. Vitamin D3 analogue EB1089 inhibits the proliferation of human laryngeal squamous carcinoma cells via p57. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(5):1268–1274.
214. Croft DR, Olson MF. Transcriptional regulation of Rho GTPase signaling. *Transcription.* 2011;2(5):211–215.
215. Ge Z, Li B, Zhou X, Yang Y, Zhang J. Basic fibroblast growth factor activates b - catenin / RhoA signaling in pulmonary fibroblasts with chronic obstructive pulmonary disease in rats. *Mol Cell Biochem.* 2016; 423(1-2): 165-174.
216. Datta A, Sandilands E, Mostov KE, Bryant DM. Fibroblast-derived HGF drives acinar lung cancer cell polarization through integrin-dependent RhoA-ROCK1 inhibition. 2017; 40:91-98.
217. Alkasalias T, Alexeyenko A, Hennig K, Danielsson F, Lebbink RJ, Fielden M, et al. RhoA knockout fibroblasts lose tumor-inhibitory capacity in vitro and promote tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(8):1413–1421.
218. Martin K, Reimann A, Fritz RD, Ryu H, Jeon NL, Pertz O. Spatio-temporal coordination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics. *Sci Rep.* 2016;6(1):21901.
219. Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagai H, Misutani A, Matsuda C, et al. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet.* 2007;16(6):618–629.
220. Lopez-Dee Z, Pidcock K, Gutierrez LS. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators Inflamm.* 2011;296069.
221. Amarasekera AT, Assadi-Khansari B, Liu S, Black M, Dymmott G, Rogers NM,

- et al. Vitamin D supplementation lowers thrombospondin-1 levels and blood pressure in healthy adults. *PLoS One*. 2017;12(5):e0174435.
222. García-Quiroz J, Rivas-Suárez M, García-Becerra R, Barrera D, Martínez-Reza I, Ordaz-Rosado D, et al. Calcitriol reduces thrombospondin-1 and increases vascular endothelial growth factor in breast cancer cells: Implications for tumor angiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144:215–222.
223. Verbrugge SE, Scheper RJ, Lems WF, de Gruijl TD, Jansen G. Proteasome inhibitors as experimental therapeutics of autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):17.
224. Mariano A, Henning A, Han R. Dysferlin-deficient muscular dystrophy and innate immune activation. *FEBS J*. 2013; 280(17): 4165–4176.
225. Biro M, Munoz MA, Weninger W. Targeting Rho-GTPases in immune cell migration and inflammation. *Br J Pharmacol*. 2014;171(24):5491–5506.
226. Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res*. 2004; 301(1):43-49.
227. Ren H, Li Y, Chen Y, Wang L. Endostatin attenuates PDGF-BB- or TGF- $\beta$ 1-induced HSCs activation via suppressing RhoA/ROCK1 signal pathways. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:285–290.
228. Di SA, Bendia E, Svegliati-Baroni G, Marzioni M, Ridolfi F, Trozzi L, et al. Rearrangement of the cytoskeletal network induced by platelet-derived growth factor in rat hepatic stellate cells: role of different intracellular signalling pathways. *JHepatol*. 2002;36:179–190.
229. Zhang Y, Wu S. Effects of fasudil on pulmonary hypertension in clinical practice. *Pulm Pharmacol Ther*. 2017;46: 54–63.
230. Tan EML, Qin H, Kennedy SH, Rouda S, Fox IV JW, Moore JH. Platelet-derived growth factors-AA and -BB regulate collagen and collagenase gene expression differentially in human fibroblasts. *Biochem J*. 1995;310(2):585–588.
231. Lepisto J, Peltonen J, Vahakreula M, Niinikoski J, Laato M. Platelet-Derived

- Growth Factor Isoforms PDGF-AA, PDGF-AB and PDGF-BB Exert Specific Effects on Collagen Gene Expression and Mitotic Activity of Cultured Human Wound Fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209(2):393–399.
232. Xu N, Chen S-H, Qu G-Y, Li X-D, Lin W, Xue X-Y, et al. Fasudil inhibits proliferation and collagen synthesis and induces apoptosis of human fibroblasts derived from urethral scar via the Rho/ROCK signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2017;9(3):1317–1325.
233. Działo E, Tkacz K, Błyszczuk P. Crosstalk between the TGF- $\beta$  and WNT signalling pathways during cardiac fibrogenesis. *Acta Biochem Pol.* 2018;65(3):341-349.
234. Shaifta Y, MacKay CE, Irechukwu N, O'Brien KA, Wright DB, Ward JPT, et al. Transforming growth factor- $\beta$  enhances Rho-kinase activity and contraction in airway smooth muscle via the nucleotide exchange factor ARHGEF1. *J Physiol.* 2018;596(1):47–66.
235. Carlier R-Y, 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.* 2011;21(11):791–799.
236. 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.* 2015;38(3):565–572.
237. Lagalice L, Pichon J, Gougeon E, Soussi S, Deniaud J, Ledevin M, et al. Satellite cells fail to contribute to muscle repair but are functional in Pompe disease (glycogenosis type II). *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6(1):116.
238. Smith LR, Barton ER. Regulation of fibrosis in muscular dystrophy. *Matrix Biol.* 2018;68–69:602–615.
239. Pascarella A, Terracciano C, Farina O, Lombardi L, Esposito T, Napolitano F, et al. Vacuolated PAS-positive lymphocytes as an hallmark of Pompe disease and other myopathies related to impaired autophagy. *J Cell Physiol.* 2018; 233(8):

5859-5837.

240. RabeN N, Plotz P. Role of autophagy in the pathogenesis of Pompe disease. *Acta Myol.* 2007;26(1):45–48.
241. Walter MC, Reilich P, Thiele S, Schessl J, Schreiber H, Reiners K, et al. Treatment of dysferlinopathy with deflazacort: A double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8(1):8-26

## 10. ANEXO



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## PDGF-BB serum levels are decreased in adult onset Pompe patients

Received: 24 July 2018  
Accepted: 19 December 2018  
Published online: 14 February 2019

Esther Fernández-Simón<sup>1</sup>, Ana Carrasco-Rozas<sup>1</sup>, Eduard Gallardo <sup>1,2</sup>, Sebastián Figueroa-Bonaparte<sup>1</sup>, Izaskun Belmonte<sup>3</sup>, Irene Pedrosa<sup>3</sup>, Elena Montiel<sup>3</sup>, Xavier Suárez-Calvet<sup>1,2</sup>, Jorge Alonso-Pérez<sup>1</sup>, Sonia Segovia<sup>1,2</sup>, Claudia Nuñez-Peralta<sup>4</sup>, Jaume Llauger<sup>4</sup>, Mercedes Mayos<sup>5</sup>, Isabel Illa<sup>1,2</sup>, Spanish Pompe Study Group\* & Jordi Díaz-Manera<sup>1</sup>

Adult onset Pompe disease is a genetic disorder characterized by slowly progressive skeletal and respiratory muscle weakness. Symptomatic patients are treated with enzymatic replacement therapy with human recombinant alfa glucosidase. Motor functional tests and spirometry are commonly used to follow patients up. However, a serological biomarker that correlates with the progression of the disease could improve follow-up. We studied serum concentrations of TGFβ, PDGF-BB, PDGF-AA and CTGF growth factors in 37 adult onset Pompe patients and 45 controls. Moreover, all patients performed several muscle function tests, conventional spirometry, and quantitative muscle MRI using 3-point Dixon. We observed a statistically significant change in the serum concentration of each growth factor in patients compared to controls. However, only PDGF-BB levels were able to differentiate between asymptomatic and symptomatic patients, suggesting its potential role in the follow-up of asymptomatic patients. Moreover, our results point to a dysregulation of muscle regeneration as an additional pathomechanism of Pompe disease.

Pompe disease is an autosomal recessive disorder produced by mutations in the *GAA* gene, which codifies the enzyme acid alpha-glucosidase<sup>1</sup>. This enzyme metabolizes glycogen to glucose inside the lysosomes of the cells. A lack of it leads to an accumulation of glycogen in body tissues such as liver, neurons, smooth, skeletal or cardiac muscle<sup>2</sup>. Pompe disease has a wide clinical spectrum ranging from the classical infantile disease (IOPD) to late onset phenotype. IOPD patients develop a quickly progressive disease characterized by generalized muscle weakness and hypertrophic cardiomyopathy, leading to death in the first year of life if left untreated<sup>3</sup>. Enzymatic replacement therapy with alfa-glucosidase (ERT) is started as early as possible, because IOPD is life-threatening disorder and ERT clearly change patients' clinical condition<sup>4,5</sup>.

In contrast, adult onset Pompe patients (AOPD) can have heterogeneous clinical presentations, ranging from isolated hyperckemia to weakness involving the respiratory, axial, pelvic and scapular girdle muscles<sup>6,7</sup>. Natural history studies suggest that muscle weakness in AOPD progresses very slowly. In some cases, patients develop subtle muscle symptoms, such as postural abnormalities or a change in their walking pattern, that do not influence general motor function and can therefore delay medical consultation<sup>8,9</sup>. Unlike the procedure for IOPD, guidelines recommend starting ERT in AOPD only if muscle or respiratory weakness is detected in clinical examination<sup>10</sup>. In fact, asymptomatic AOPD patients are currently followed up using different muscle function tests to try to identify changes in motor performance that could lead to the initiation of treatment<sup>11</sup>. However, it is possible that the process of muscle degeneration and fibro-fatty substitution, which is irreversible, could have started without yet producing significant changes in motor functional tests<sup>12</sup>. Moreover, it is not certain that common muscle function tests, such as the 6 minute walking test (6MWT), are precise enough to detect slight

<sup>1</sup>Neuromuscular Disorders Unit. Neurology Department Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Centro de Investigación en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Rehabilitation and physiotherapy department Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Radiology department Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Respiratory department. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. \*A comprehensive list of consortium members appears at the end of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.D.-M. (email: [jdiazm@santpau.cat](mailto:jdiazm@santpau.cat))

	Patients		
	Symptomatic	Asymptomatic	p*
Number of patients	29	8	
Gender (W)	18, 62.1%	4, 50%	0.21
Age at baseline	51 (31–65)	21 (8–51)	0.001
Time from onset of symptoms	17 (4–42)		
Patients on ERT	22	—	
Time on ERT	4.3 (1–9)	—	
Aids for walking	10	—	
Ventilation	13	—	

**Table 1.** Demographic and clinical data of Pompe patients. Comparisons between symptomatic and asymptomatic patients are shown with p-value. P was considered significant if lower than 0.05.

changes in motor performance<sup>13</sup>. For these reasons, having a serum growth factor able to identify patients in which fibro-fatty substitution has begun, would be of great utility<sup>14,15</sup>.

The main aim of our research was to study the serum concentration of a group of growth factors related to muscle fibrosis, degeneration and inflammation, in a cohort of 37 symptomatic and asymptomatic AOPD patients. We compared the serum concentration of Pompe patients with a control group. We also studied whether there were differences in the serum concentration of these growth factors between symptomatic and asymptomatic patients. In parallel, we evaluated the patients using several motor function tests, spirometry, quantitative muscle MRI (qMRI), and patient-reported outcome measures (PROMs), in order to establish whether or not a correlation between serum concentration and the clinical situation of the patients exists.

## Results

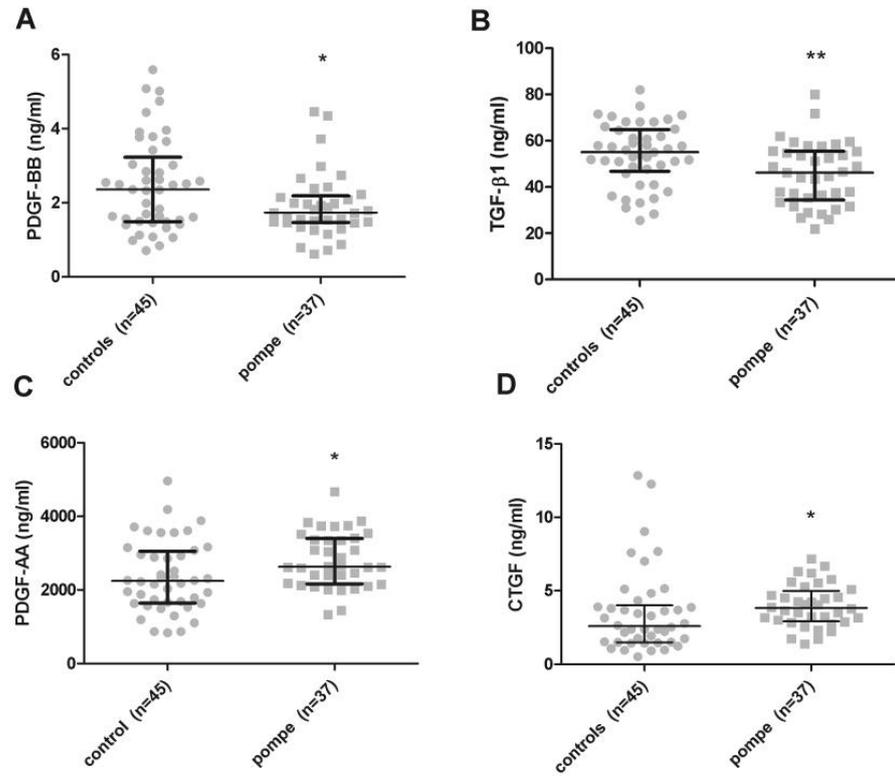
**Description of the cohort.** 37 AOPD patients were included in the study. Twenty-nine patients were symptomatic (18 women, 62.1%) and 8 were asymptomatic. Twenty-three of the 29 symptomatic patients were already receiving ERT when first sample was obtained. In the remaining 6 symptomatic patients, blood samples were obtained before ERT was started. Asymptomatic patients were studied in neuromuscular disorder units because high levels of hepatic enzymes or CKs were found in random checkup blood analyses (5 cases) or because they had relatives already diagnosed with Pompe disease (3 cases). The demographic and clinical data of these two groups are described in Table 1. Results of the motor function tests and muscle MRI of the Pompe cohort has been already reported<sup>15,16</sup>. We compared the ELISA results with serums obtained from age- and sex-matched controls (n = 45).

**Growth factor serum levels in Pompe patients compared to controls.** Our first aim was to study whether there were differences in growth factor serum levels between Pompe patients and controls. We observed significant differences in PDGF-BB, TGF- $\beta$ , PDGF-AA and CTGF levels as is shown in Fig. 1. Serum PDGF-BB and TGF- $\beta$ 1 levels were significantly lower in Pompe patients compared to the control group. In the case of PDGF-BB, the median and interquartile range (IQR) value of Pompe serum levels were of 1.739 ng/ml (IQR: 1.467–2.186) compared to 2.360 ng/ml (IQR: 1.494–3.23) in controls (Mann-Whitney U test,  $p = 0.047$ ). In the case of TGF- $\beta$ 1, Pompe median serum levels were of 46.17 ng/ml (IQR: 36.34–55.48) compared to 55.05 ng/ml (IQR: 46.79–64.8) in controls (Mann-Whitney U test,  $p = 0.007$ ). However, serum PDGF-AA and CTGF levels were significantly higher compared to control samples. In the case of PDGF-AA, the median Pompe serum levels were 2630 ng/ml (IQR: 2161–3399) compared to 2242 ng/ml (IQR: 1642–3051) in controls (Mann-Whitney U test,  $p = 0.01$ ). And in the case of CTGF, median Pompe serum levels were of 3.831 ng/ml (2.917–4.999) compared to 2.589 ng/ml (1.503–4.013) in controls (Mann-Whitney U test,  $p = 0.023$ ).

**PDGF-BB levels differentiate between symptomatic and asymptomatic Pompe patients.** Our second aim was to assess whether any of the growth factors studied was able to differentiate between asymptomatic and symptomatic Pompe patients (Fig. 2). We observed that PDGF-BB levels were significantly lower in symptomatic patients (Median: 1.565 ng/ml (IQR: 1.405–2.096) compared to asymptomatic Pompe patients (Median: 2.038 ng/ml (IQR: 1.907–3.803) (Mann-Whitney U test,  $p = 0.044$ ) (Fig. 2A). In contrast, we did not identify differences in TGF- $\beta$ 1, CTGF and PDGF-AA serum concentration between symptomatic and asymptomatic patients.

As there were significant differences in age between symptomatic and asymptomatic Pompe patients (Table 1), we decided to add a new group of young controls with a mean age of 23 years. We observed significant differences in PDGF-BB serum levels between symptomatic Pompe patients and all other groups, including young controls (mean age = 23 years old) (Mann-Whitney U test,  $p = 0.0012$ ), all controls and asymptomatic Pompe patients. We did not observe significant differences between controls of different ages and between asymptomatic Pompe patients and young controls (Mann-Whitney U test,  $p > 0.05$ ) (Fig. 3).

To further analyze whether PDGF-BB serum levels were useful for differentiating between symptomatic or asymptomatic patients, we used a receiver operating characteristics curve, or ROC curve, and analyzed area under the curve (AUC). The ROC curve (AUC: 0.737,  $p = 0.042$ , 95%CI: 0.539–0.935) (Fig. 4) confirmed that PDGF-BB levels were able to predict which patients were symptomatic and which were asymptomatic. Therefore,



**Figure 1.** Serum levels of different cytokines in control group and pompe group. (A) PDGF-BB levels, (B) TGF-β1, (C) PDGF-AA and (D) CTGF levels were measured. Variables are represented as median and interquartile range (IQR). Statistical significance of the results by Mann-Whitney test: \* $p \leq 0.05$  and \*\* $p \leq 0.01$ .

patients with lower values than the cut-off level (1.97 ng/ml) had a higher probability of being asymptomatic. Sensitivity and specificity were 75% and 76% respectively.

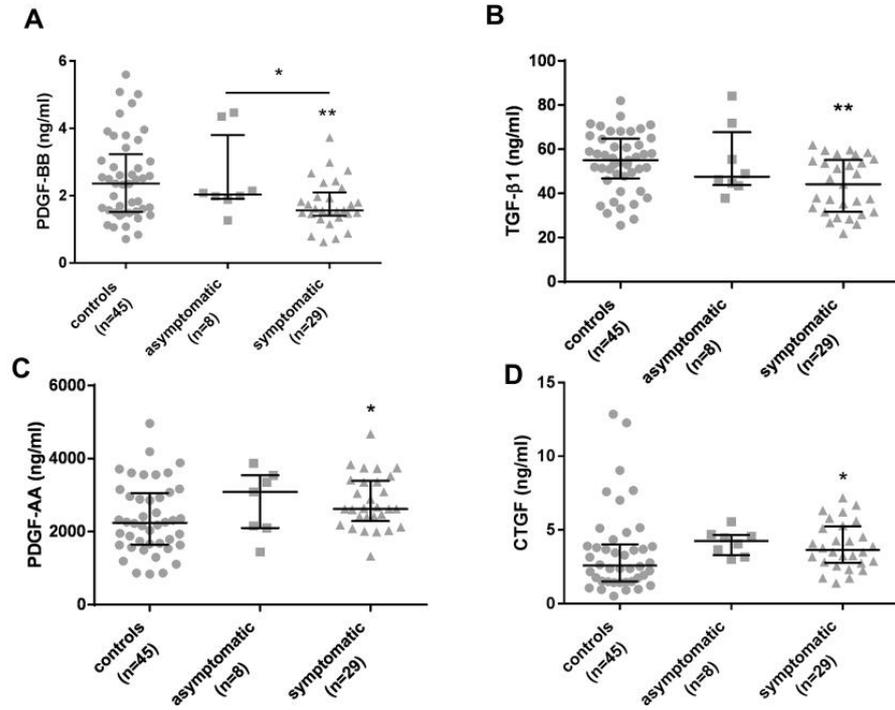
**PDGF-BB levels decrease in Pompe patients but not in other muscle dystrophies.** Since the function of PDGF-BB seems to be related with muscle regeneration, we analyzed serum levels of this growth factor in other muscle dystrophies in which regeneration increases, such as Duchenne muscle dystrophy (DMD), Becker muscle dystrophy (BMD) dysferlinopathy (DYSF) and facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSH). Clinical and demographic features of these groups are described in Table 2.

We observed that PDGF-BB levels were significantly higher in DMD (Median: 3.14 ng/ml (IQR: 1.6–6.76) (Mann-Whitney U test,  $p = 0.0469$ ) and BMD (Median: 3.681 ng/ml (IQR: 2.945–4.398) (Mann-Whitney U test,  $p = 0.0077$ ) compared to controls. We also obtained significant differences in DMD, BMD and FSH (Median: 3.656 ng/ml (IQR: 1.944–5.443) (Mann-Whitney U test,  $p = 0.0052$ ) compared to Pompe disease (DMD: Mann-Whitney U test,  $p = 0.0065$ ; DMB: Mann-Whitney U test,  $p = 0.0001$ ) (Fig. 5).

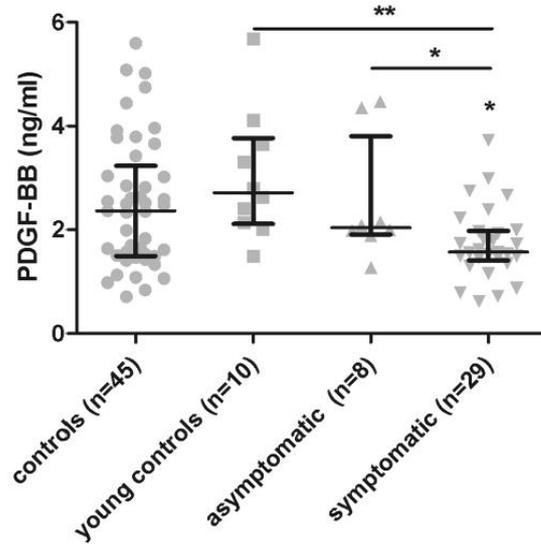
**Correlation between PDGF-BB serum levels and results of muscle function tests and quantitative muscle MRI.** We used the Spearman test to identify if there were any correlations between PDGF-BB serum concentration and the results of the muscle function tests, spirometry, patient-reported outcomes and qMRI. As it is shown in Table 3, we did not find any significant correlation. However, we found a non-significant tendency between PDGF-BB levels and 6MWT, the MRC score, the Myometry score, MIP, and thigh fat fraction measured using 3 point Dixon MRI.

## Discussion

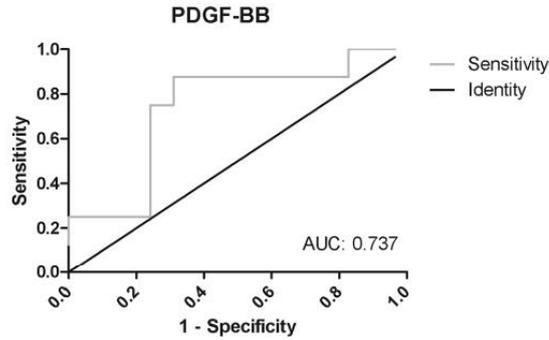
In the present study, we found significant differences in the serum concentration of four growth factors related to the process of skeletal muscle degeneration and regeneration in AOPD patients compared to controls. However, only serum levels of PDGF-BB were significantly different when symptomatic patients were compared with asymptomatic patients. In fact, the diagnostic accuracy of the PDGF-BB concentration to distinguish between symptomatic and asymptomatic patients was assessed by ROC curves, determining an optimal cut-off value of 1.97 ng/ml.



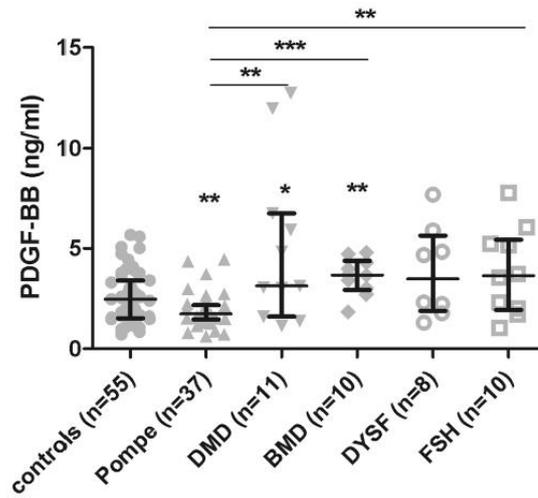
**Figure 2.** Serological levels of four growth factors in three different groups: control, symptomatic Pompe patients and asymptomatic Pompe patients. (A) PDGF-BB levels, (B) TGF-β1, (C) PDGF-AA and (D) CTGF levels were measured. Variables are represented as median and interquartile range (IQR). Comparisons were made using Mann-Whitney test. Statistical significance of the results; \* $p \leq 0.05$  and \*\* $p \leq 0.01$ .



**Figure 3.** Serological levels of PDGF-BB in different groups: control, young controls, asymptomatic and symptomatic Pompe patients. Variables are represented as median and interquartile range (IQR). Comparisons were made using Mann-Whitney test. Statistical significance of the results; \* $p \leq 0.05$  and \*\* $p \leq 0.01$ .



**Figure 4.** Receiver-operator characteristic (ROC) curve of the PDGF-BB for distinguishing symptomatic and asymptomatic patients. The area under the curve (AUC) for PDGF-BB was 0.737 with a P value of 0.042 and 95% confidence interval (CI) were 0.539–0.935).



**Figure 5.** Serum levels PDGF-BB in muscle dystrophies: Pompe, Duchenne muscle dystrophy (DMD), Becker muscle dystrophy (BMD), dysferlinopathy (DYSF) and facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSH). Variables are represented as median and interquartile range (IQR). Statistical significance of the results by Mann-Whitney test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

	DMD (n:11)	BMD (n:10)	Dysferlinopathy (n:8)	FSHD (n:10)	Pompe (n:37)
Age	11.75 y.o	32.93 y.o.	35.92 y.o.	49.62 y.o.	34.5 y.o
Gender	11 men	10 men	4 men	6 men	15 men
Unassisted walk	7	3	4	6	27
Aids for walking	4	3	4	4	10
Ventilator	1	1	0	1	13

**Table 2.** Demographic and clinical data of patients with muscle disorders included in this report. DMD: Duchenne muscle dystrophy; BMD: Becker muscle dystrophy; FSHD: facioscapulohumeral muscle dystrophy; y.o.: years old.

It is well known that chronic muscle damage leads to persistent inflammatory infiltration, muscle necrosis and activation of fibro/adipogenic progenitor (FAP) cells<sup>17</sup>, something that has been studied in dystrophic muscles. Eventually, muscle fibers are lost and substituted by fibro-adipose tissue<sup>18</sup>. Several growth factors have been related with this process, including those in the present study. TGF- $\beta$ 1 and PDGF-BB play an important role in satellite cell proliferation and fibrotic remodeling<sup>19–21</sup>. TGF- $\beta$ 1 is crucial in the initiation of fibrosis in skeletal

Test	Spearman	Correlation coefficient
<b>Muscle function tests</b>		
6 MWT	0.055	0.33
Time to walk 10 meters	0.24	
Timed up&go test	0.81	
Time to climb 4 steps	0.17	
Time to descend 4 steps	0.26	
MRC score	0.07	0.31
Myometry score	0.07	0.31
MFM-20	0.77	
<b>Spirometry</b>		
CVF seated	1	
CVF supine	0.28	
MIP	0.057	-0.48
MEP	0.80	
<b>Patients reported outcomes</b>		
Activlim	0.84	
SF36	0.80	
INQoL	0.70	
<b>Quantitative muscle MRI</b>		
Thighs fat fraction	0.08	-0.28
Paraspinal fat fraction	0.2	

**Table 3.** Correlation between PDGF-BB levels and results of the muscle function tests, spirometry, patients reported outcomes and qMRI. Spearman test was used to study if there was a correlation. P was considered significant if lower than 0.05. Correlation coefficient is shown for variables in which a tendency was found.

muscle<sup>20–22</sup>, and PDGF-AA enhances the process of fibro-adipogenic expansion regulated by FAP cells<sup>23–26</sup>. CTGF influences the fibrotic process by inducing the expression and release of collagen type 1 by activated fibroblasts<sup>26–28</sup>. Although the process of muscle degeneration has been well established in animal models of muscular dystrophies such as Duchenne muscle disease, it is not yet completely known whether it happens in the same way as in Pompe disease. However, radiological studies show that skeletal muscle is gradually lost and substituted by fat tissue in patients with adult onset Pompe, mimicking what happens in patients with muscular dystrophies and suggesting a similar skeletal muscle degenerative process<sup>29–31</sup>. Based on this hypothesis, we decided to study the serum concentration of growth factors related with the process of muscle regeneration, degeneration and fibrosis.

PDGF-BB, which is secreted by inflammatory cells and skeletal muscle regenerative fibers, has recently been related with the process of muscle regeneration through the activation of satellite cell proliferation and chemotaxis<sup>32</sup>. We observed lower levels of serum PDGF-BB in AOPD patients compared to controls. Moreover, PDGF-BB serum concentration was even lower in symptomatic patients, suggesting a correlation with disease progression. As PDGF-BB probably influences muscle regeneration, the lower levels found in AOPD patients might reflect impaired regenerative response in Pompe disease, something that has also been suggested by other authors. Impaired satellite cell activation has been described in muscle samples from Pompe patients<sup>33–35</sup>. Moreover, serum levels of insulin growth-factor-1 and myostatin, two molecules related with the process of satellite cell activation, are lower in serum of Pompe patients compared to controls<sup>36</sup>.

We did not observe a significant difference in serum levels of TGF- $\beta$ 1, PDGF-AA and CTGF in symptomatic compared to asymptomatic Pompe patients. These three factors have been related with the process of muscles fibrosis, as discussed early. The lower levels of TGF- $\beta$ 1 found in Pompe patients compared to controls, supports the idea that fibrosis is not a major issue in patients with Pompe disease. In fact, Dr. Palermo<sup>37</sup> and collaborators did not find an up-regulation of *TGFB1* fibrosis-associated genes in skeletal muscle Pompe patients, which supports our findings.

The lower levels of growth factors related to fibrosis and regeneration suggested by the current study could be explained by the lack of sarcolemma damage in Pompe disease. In most muscular dystrophies in which the process of muscle degeneration and regeneration has been studied, muscle damage is produced because of the instability of skeletal muscle membrane. Membrane tears induce a series of responses, such as the release by muscle fibers of cytokines that recruit inflammatory cells and participate in the activation of satellite cells. Persistent inflammatory cells release profibrotic growth factors that lead to the expansion of fibrotic tissue. The process of muscle fiber degeneration in Pompe disease is probably different. There is no evidence of necrosis or inflammatory infiltration<sup>38</sup>. As opposed to muscle membrane instability, lysosomal rupture has been proposed as the main mechanism leading to muscle fiber necrosis. Glycogen progressively accumulates in lysosomes producing their rupture and the release of lytic enzymes to the sarcoplasm, probably activating the process of autophagy<sup>38,39</sup>. It is tempting to hypothesize that local cell response is different in Pompe disease, with no recruitment of inflammatory cells, no activation of satellite cells and no release of profibrotic factors. The fact that PDGF-BB levels were higher in serum samples from patients with other muscular dystrophies, and lower in Pompe disease, supports this hypothesis.

The identification of growth factors useful for the follow-up of patients is considered one of the unmet needs in Pompe disease. ERT is being administered to those symptomatic patients, patients with muscle or respiratory muscle weakness. However, patients may develop mild motor disturbances, such as abnormal gait posture, due to the presence of mild axial involvement. Growth factors capable of differentiating between symptomatic and asymptomatic patients could then be a useful tool in follow-up. As we observed significant lower PDGF-BB levels in symptomatic Pompe patients than asymptomatic, we suggest PDGF-BB could be useful to monitorize progression of the disease and help to identify those patients in which the process of muscle degeneration has started without influencing muscle function yet. Other growth factors previously proposed, such as urine glucose tetrasaccharide Glc4 levels<sup>40,41</sup>, have utility in the diagnosis of Pompe disease, or in monitoring of the treatment but not for differentiating between symptomatic and asymptomatic patients<sup>42,43</sup>.

To summarize, we have identified a group of four growth factors related to the process of muscle degeneration and regeneration that are differently expressed in Pompe patients compared to controls. Interestingly, PDGF-BB levels were significantly different in symptomatic patients compared to asymptomatic. In our opinion, our results suggest that decreasing levels of PDGF-BB in asymptomatic patients should prompt us to tighten the follow-up of the patient, repeating muscle and respiratory function tests in order to consider starting ERT before muscle degeneration becomes irreversible.

## Methods

**Patients and study design.** This study is part of an ongoing prospective open-label study in which we are following up a group of symptomatic and non-symptomatic AOPD patients annually in our center using muscle function tests, muscle MRI and blood analysis. This study has been registered in Clinicaltrials.gov (identifier NCT01914536). The present research was performed in accordance with Spanish regulation for clinical trials and studies and following the recommendations described in the Declaration of Helsinki. The study was approved by The Ethical Committee of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) in Barcelona. All participants signed an appropriate informed consent form.

The diagnosis of Pompe disease was based on the presence of two mutations in the GAA gene. In cases where a single or no mutation was detected, diagnosis was based on reduced activity in at least two tissues, lymphocytes and skeletal muscle being the most common tissues studied, as has been recently suggested by the European Pompe Consortium<sup>10</sup>. All patients were considered adult onset since none of them developed symptoms before the age of 18.

We defined a patient as symptomatic when we identified muscle weakness in clinical examination using the Muscle Research Council score (MRC), or when Forced Vital Capacity (FVC), while seated, was lower than 85%. A total of 37 patients were included: 23 symptomatic patients treated with ERT, 6 symptomatic patients untreated with ERT and 8 asymptomatic patients. All treated patients received 20 mg/kg acid alpha-glucosidase intravenously every other week. Untreated symptomatic patients were seen before starting ERT. Clinical and genetic features of this group of patients have been previously published<sup>15</sup>. In summary, mean age at baseline visit of the 23 symptomatic patients was 49.8 years old. 9 of these patients used sticks or wheelchair for walking, with two of them being fully wheelchair bound. 12 patients used non-invasive ventilation at night. Mean age of the 6 non-treated symptomatic patients was 37.4 years old. Only one patient of this group used the stick for walking and one other patient required noninvasive ventilation at night. 8 presymptomatic AOPD patients were also included (mean age 21 years, 4 women). These patients were diagnosed of Pompe disease because they were relatives of patients with Pompe or because the presence of high CK levels in blood samples. As controls we included 45 patients whose age and sex matched our Pompe cohort (mean age 48 years, 29 women), and 10 more controls whose age and sex matched with asymptomatic Pompe patients (mean age 23 years, 6 women). The controls were volunteers, most of them relatives or caregivers of our Pompe patients that kindly agreed to participate in the study. CKs levels were normal in all control patients (Reference value for our laboratory is <174 U/L).

**Growth factors identification.** Blood samples were collected at baseline visit before motor function tests were performed. Blood was centrifuged for 1600 g for 9 minutes at 4 °C in order to separate the serum. The serum was aliquoted and stored at -80 °C until analysis.

Serum platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) levels were measured using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. A platelet-derived growth factor AA (PDGF-AA) human ELISA kit was provided by ThermoFisher (Thermo Fisher Scientific, Nepean, Canada) and connective tissue growth factor (CTGF) by EIAAB Science Co (Wuhan, China). Minimum detectable cytokine concentrations for these assays were measured to be 1.7 pg/ml for TGF- $\beta$ 1, 15 pg/ml for PDGF-BB, 40 pg/ml for PDGF-AA and 0.18 ng/ml for CTGF. Samples were measured in duplicate and read on a microplate reader Beckman Coulter AD 340 (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) with AD-LD software.

**Muscle function tests.** All patients were evaluated by three physiotherapists (I.B., I.P. and E.M.), with experience in neuromuscular disorders, at HSCSP in Barcelona. Physiotherapists evaluated muscle function using the following tests: the 6MWT, time to walk 10 meters, timed up-and-go test, time to climb up and down 4 steps, and the 20 item motor function measure tool (MFM-20). Muscle strength was studied using both MRC and hand-held myometry. The MRC score was the sum of all individual MRC values, while the myometry score was the sum of all individual muscle values. ACTIVLIM, INQoL and SF-36 were used as patient-reported outcome measures. Forced vital capacity while seated and in a lying position, maximum inspiratory pressure (MIP) and maximum expiratory pressure (MEP) values were obtained with a Carefusion Microlab ML 3500 MK8 spirometer (Carefusion, Yorba Linda, CA, USA).

**Muscle imaging.** All patients were examined in a Philips Achieva XR 1.5 Teslas located at HSCSP. We used the same positioning protocol for all patients: supine position with legs stretched, the patella facing upward and the ankles in a neutral position.

3D 3-point Dixon images were acquired with the following acquisition parameters: TR/TE = 5.78/1.8, 4 ms, flip angle = 15°, FOV = 520 × 340 × 300 mm, voxel size = 1 × 1 × 3 mm.

Analysis of the 3-point Dixon MR images was performed using the PRIDE (Philips Research Image Development Environment) tool, as has been reported previously<sup>15,42</sup>. ROIs were manually drawn on five slices of the following muscles: *rectus femoris*, *vastus intermedius*, *vastus lateralis*, *vastus medialis*, *adductor magnus*, *sartorius*, *gracilis*, *semitendinosus* and *semimembranosus*, and on three slices of *biceps femoris long head*, *biceps femoris short head* and *adductor longus*.

**Data analysis.** Non-parametric tests were used for the statistical analysis of the variables. The Mann-Whitney U test investigated whether there were significant differences in variables between groups (symptomatic vs asymptomatic and control vs Pompe). We used Spearman's rank correlation (coefficient reported as  $\rho$ ) to investigate any correlation between the serum concentration of growth factors and the results of the muscle function tests, spirometry, quality of life scales and the thigh fat fraction obtained using qMRI. As we ran multiple correlations, a Bonferroni test was performed to avoid type 1 errors. Finally, a ROC curve was performed to study whether PDGF-BB levels were able to differentiate between symptomatic and asymptomatic Pompe patients with high sensitivity and specificity. The results of all statistical studies were considered significant if P was lower than 0.05. Statistical studies were performed using IBM SPSS® Statistics software version 21. The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### Data Availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### References

- van der Ploeg, A. T. & Reuser, A. J. J. Pompe's disease. *Lancet (London, England)* **372**, 1342–53 (2008).
- Fukuda, T., Roberts, A., Plotz, P. H. & Raben, N. Acid alpha-glucosidase deficiency (Pompe disease). *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **7**, 71–7 (2007).
- Bembi, B. *et al.* Diagnosis of glycogenosis type II. *Neurology* **71**, S4–11 (2008).
- Yang, C.-F. *et al.* Very Early Treatment for Infantile-Onset Pompe Disease Contributes to Better Outcomes. *J. Pediatr.* **169**, 174–180.e1 (2016).
- Parini, R. *et al.* Long term clinical history of an Italian cohort of infantile onset Pompe disease treated with enzyme replacement therapy. *Orphanet J. Rare Dis.* **13**, 32 (2018).
- Hagemans, M. L. C. *et al.* Disease severity in children and adults with Pompe disease related to age and disease duration. *Neurology* **64**, 2139–2141 (2005).
- Schüller, A., Wenninger, S., Strigl-Pill, N. & Schoser, B. Toward deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* **160C**, 80–88 (2012).
- McIntosh, P. T., Case, L. E., Chan, J. M., Austin, S. L. & Kishnani, P. Characterization of gait in late onset Pompe disease. *Mol. Genet. Metab.* **116**, 152–6 (2015).
- Valle, M. S. *et al.* Quantitative analysis of upright standing in adults with late-onset Pompe disease. *Sci. Rep.* **6**, 37040 (2016).
- van der Ploeg, A. T. *et al.* European consensus for starting and stopping enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year experience. *Eur. J. Neurol.* **24**, 768–e31 (2017).
- Working Group, M. E. N. A. P. F. *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.* **15**, 205 (2015).
- Wallace, G. Q. & McNally, E. M. Mechanisms of Muscle Degeneration, Regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 37–57 (2009).
- Morrow, J. M. *et al.* MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *Lancet Neurol.* **15**, 65–77 (2016).
- Straub, V. *et al.* Stakeholder cooperation to overcome challenges in orphan medicine development: the example of Duchenne muscular dystrophy. *Lancet. Neurol.* **15**, 882–890 (2016).
- Figuerola-Bonaparte, S. *et al.* Muscle MRI Findings in Childhood/Adult Onset Pompe Disease Correlate with Muscle Function. *PLoS One* **11**, e0163493 (2016).
- Figuerola-Bonaparte, S. *et al.* Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: a prospective study. *Sci. reports* **8**, 10898 (2018).
- Smith, L. R. & Barton, E. R. Regulation of fibrosis in muscular dystrophy. *Matrix Biol.* **68–69**, 602–615 (2018).
- Joe, A. W. B. *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 153–163 (2010).
- Yablonka-Reuveni, Z., Balestreri, T. M. & Bowen-Pope, D. F. Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by specific isoforms of PDGF. *J. Cell Biol.* **111**, 1623–9 (1990).
- Li, Y. *et al.* Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces the Differentiation of Myogenic Cells into Fibrotic Cells in Injured Skeletal Muscle. *Am. J. Pathol.* **164**, 1007–1019 (2004).
- Kamila, D., Paulina, K., A., C. M. & Malgorzata, Z. The role of TGF- $\beta$ 1 during skeletal muscle regeneration †. *Cell Biol Int* **41**, 706–715 (2017).
- Zanotti, S., Gibertini, S. & Mora, M. Altered production of extra-cellular matrix components by muscle-derived Duchenne muscular dystrophy fibroblasts before and after TGF- $\beta$ 1 treatment. *Cell Tissue Res* **339**, 397–410 (2010).
- Ieronimakis, N. *et al.* PDGFR signalling promotes fibrogenic responses in collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J. Pathol. J Pathol* **240**, 410–424 (2016).
- Burks, T. N. & Cohn, R. D. Role of TGF- $\beta$  signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet. Muscle* **1**, 19 (2011).
- Olson, L. E. & Soriano, P. Increased PDGFR $\alpha$  activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev. Cell* **16**, 303–13 (2009).
- Kendall, R. T. & Feghali-Bostwick, C. A. Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* **27**, 1–13 (2014).
- Leask, A. CCN2: a novel, specific and valid target for anti-fibrotic drug intervention. *Expert Opin. Ther. Targets* **17**, 1067–1071 (2013).

28. Morales, M. G. *et al.* CTGF/CCN-2 over-expression can directly induce features of skeletal muscle dystrophy. *J. Pathol.* **225**, 490–501 (2011).
29. Carlier, R.-Y. *et al.* Whole-body muscle MRI in 20 patients suffering from late onset Pompe disease: Involvement patterns. *Neuromuscul. Disord.* **21**, 791–799 (2011).
30. Carlier, P. G. *et al.* Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging follow-up of adult Pompe patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* **38**, 565–572 (2015).
31. Alejandre, A. *et al.* Trunk muscle involvement in late-onset Pompe disease: study of thirty patients. *Neuromuscul. Disord.* **22**(Suppl 2), S148–54 (2012).
32. Piñol-Jurado, P. *et al.* Platelet-Derived Growth Factor BB Influences Muscle Regeneration in Duchenne Muscle Dystrophy. *Am. J. Pathol.* **187**, 1814–1827 (2017).
33. Thurberg, B. L. *et al.* Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab. Invest.* **86**, 1208–1220 (2006).
34. Schaaf, G. J. *et al.* Lack of robust satellite cell activation and muscle regeneration during the progression of Pompe disease, <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0243-x>.
35. Lagalice, L. *et al.* Satellite cells fail to contribute to muscle repair but are functional in Pompe disease (glycogenosis type II). *Acta Neuropathol Commun.* **6**, 116 (2018).
36. Chien, Y.-H., Han, D.-S., Hwu, W.-L., Thurberg, B. L. & Yang, W.-S. Myostatin and Insulin-Like Growth Factor I: Potential Therapeutic Biomarkers for Pompe Disease. *PLoS One* **8**, e71900 (2013).
37. Palermo, A. T. *et al.* Transcriptional response to GAA deficiency (Pompe disease) in infantile-onset patients. *Mol. Genet. Metab.* **106**, 287–300 (2012).
38. Pascarella, A. *et al.* Vacuolated PAS-positive lymphocytes as an hallmark of Pompe disease and other myopathies related to impaired autophagy. *J. Cell. Physiol.* <https://doi.org/10.1002/jcp.26365>, (2017).
39. Raben, N. & Plotz, P. Role of autophagy in the pathogenesis of Pompe disease. *Acta Myol.* **26**, 45–48 (2007).
40. Young, S. P. *et al.* Assessing disease severity in Pompe disease: The roles of a urinary glucose tetrasaccharide biomarker and imaging techniques. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* **160C**, 50–58 (2012).
41. Manwaring, V. *et al.* Urine analysis of glucose tetrasaccharide by HPLC; a useful marker for the investigation of patients with Pompe and other glycogen storage diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.* **35**, 311–316 (2012).
42. An, Y. *et al.* Glucose tetrasaccharide as a biomarker for monitoring the therapeutic response to enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Mol. Genet. Metab.* **85**, 247–254 (2005).
43. Young, S. P. *et al.* Long-term monitoring of patients with infantile-onset Pompe disease on enzyme replacement therapy using a urinary glucose tetrasaccharide biomarker. *Genet. Med.* **11**, 536–541 (2009).

### Acknowledgements

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 Neil McMillan for editorial support and Ignasi Gich for support with statistics. We thank the MRI whole technician team Esther Alemany, Nieves Campillos, Elisenda Mestres, Eugenia Torres, Ricard Cullerell, Ingrid Rubio, Alberto Fernández and Mario González for their patience and support to the study. We also thank Mrs. Concepción Escolá for her assistance during the visits of the study. This investigation was sponsored by a grant from the Spanish Ministry of Health, Fondos FEDER-ISCIII PI15/01822 to Dr. Jordi Díaz-Manera and funds from Fundación Isabel Gemio.

### Author Contributions

E.F.S. performed the experimental part, analyzed the results, did the statistical analysis and prepared the figures and wrote the paper. A.C.R. and X.S.C. designed the protocol, analyzed the results and reviewed the paper. S.F.B. designed the protocol, visited the patients and analyzed muscle MRIs. S.S. coordinated the study, visited the patients and reviewed the paper. I.B., I.P. and E.M. designed the protocol, visited the patients and acquired motor function data. M.M. and J.L. designed the protocol and wrote the paper. C.N.P. and J.A.P. visited the patients and reviewed the paper. I.I. and E.G. designed and discussed the protocol. J.D.M. designed the protocol, visited the patients, analyzed the images, analyzed the results, did the statistical analysis, wrote the paper and obtained funding for the study.

### Additional Information

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

**Consortia  
Spanish Pompe Study Group**

**Miguel Angel Barba-Romero<sup>6</sup>, Joseba Barcena<sup>7</sup>, María Rosario Carzorla<sup>8</sup>, Carlota Creus<sup>9</sup>,  
Jaume Coll-Canti<sup>10</sup>, Noemí de Luna<sup>1,2</sup>, Manuel Díaz<sup>11</sup>, Cristina Domínguez<sup>12</sup>, Roberto  
Fernández-Torrón<sup>13</sup>, María José García-Antelo<sup>14</sup>, Josep María Grau<sup>15</sup>, María Teresa Gómez-  
Caravaca<sup>16</sup>, Juan Carlos León-Hernández<sup>17</sup>, Adolfo López de Munáin<sup>13</sup>, Francisco Antonio  
Martínez-García<sup>18</sup>, Yolanda Morgado<sup>19</sup>, Antonio Moreno<sup>20</sup>, Germán Morís<sup>21</sup>, Miguel Angel  
Muñoz-Blanco<sup>22</sup>, Andres Nascimento<sup>23</sup>, Carmen Paradas<sup>24</sup>, José Luis Parajuá-Pozo<sup>25</sup>, Luis  
Querol<sup>1,2</sup>, Arturo Robledo-Strauss<sup>26</sup>, Ricard Rojas-García<sup>1,2</sup>, Iñigo Rojas-Marcos<sup>27</sup>, Jose  
Antonio Salazar<sup>28</sup> & Mercedes Usón<sup>29</sup>**

<sup>6</sup>Hospital General de Albacete, Albacete, Spain. <sup>7</sup>Hospital Universitario Cruces, Baracaldo, Spain. <sup>8</sup>Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain. <sup>9</sup>Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain. <sup>10</sup>Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. <sup>11</sup>Hospital de Cabueñes, Gijón, Spain. <sup>12</sup>Hospital 12 de Octubre, Madrid & Insituto de Investigación i+12, Madrid, Spain. <sup>13</sup>Hospital Universitario Donostia, Donostia, Spain. <sup>14</sup>Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain. <sup>15</sup>Hospital Clínic, Barcelona, Spain. <sup>16</sup>Hospital de Córdoba, Córdoba, Spain. <sup>17</sup>Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria, Tenerife, Spain. <sup>18</sup>Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain. <sup>19</sup>Hospital Universitario Virgen de Valme, Sevilla, Spain. <sup>20</sup>Hospital Universitario Morales Meseguer, Murcia, Spain. <sup>21</sup>Hospital Universitario de Asturias, Oviedo, Spain. <sup>22</sup>Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain. <sup>23</sup>Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. <sup>24</sup>Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain. <sup>25</sup>Hospital de Can Mises, Ibiza, Spain. <sup>26</sup>Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain. <sup>27</sup>Hospital Virgen de Macarena, Sevilla, Spain. <sup>28</sup>Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, Spain. <sup>29</sup>Hospital de Son Llätzer, Palma de Mallorca, Mallorca, Spain.



