



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.

Tesi doctoral
Programa de doctorat de Neurociències

**Desenvolupament de noves estratègies terapèutiques per les
distròfies musculars**

Memòria presentada per Penélope Romero Duque per optar al grau de Doctora
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Treball realitzat al Laboratori de Neurologia Pediàtrica i Teràpia Gènica i Cel·lular
de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebrón (VHIR)

Directors

Jordi Barquineró Máñez

Francina Munell Casadesús

Tutor

José Aguilera

Universitat Autònoma de Barcelona

2022

La tesis doctoral amb títol “Desenvolupament de noves estratègies terapèutiques per les distròfies musculars” presentada per Penélope Romero Duque s’ha realitzat al Laboratori de Neurologia Pediàtrica i Teràpia Gènica i Cel·lular de l’Institut de Recerca de la Vall d’Hebrón (VHIR) sota la direcció de la Dra Francina Munell Casadesús i Dr Jordi Barquinero. Els directors certifiquen que aquesta memòria es apta per ser presentada per optar al grau de Doctora en Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest projecte ha estat finançat per Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) de l’institut Carlos III (Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno Español) a través del projecte “Desarrollo de una nueva estrategia de terapia génica y adecuación de una cohorte de pacientes para ensayos clínicos en distrofia muscular congénita por déficit de merosina” (PI19/00295). L’Associació de pacients ImpulsaT i l’ajuntament de Castellbisbal amb el projecte “Desenvolupament de vectors i estratègies preclíniques de teràpia gènica per la distròfia muscular congènita de tipus 1A (DMC1A)”. L’associació Duchenne Parent Project a través del projecte “Estudio de la eficacia de fármacos con capacidad de restaurar la expresión de distrofina en mioblastos de pacientes afectados de DMD con mutaciones nonsense, análisis de las causas que condicionan la variabilidad en la respuesta y evaluación de estrategias destinadas a aumentar esta eficacia en mioblastos humanos y en el ratón mdx”. La fundación Universia que va atorgar la beca per “Formación de Doctores con Discapacidad” a la doctorand en els dos primers anys de la realització d’aquesta tesis.

Barcelona, 02 de juny de 2022.



Director: Dr. Jordi Barquinero



Director : Dra. Francina Munell



Doctorand: Penélope Romero

Agraïments

“ I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician, he is also a child plazer before natural phenomenon, which impress him like a fairy tale.”

— Marie Curie

En la realització d'aquesta tesi han estat involucrats grans professionals i persones, sense l'aportació de cadascun d'ells aquesta no hagués estat possible. Tot i que no formin part explícitament d'aquestes línies, tots i cadascun de vosaltres heu estat essencials per la realització d'aquest projecte i estic molt agraïda d'haver pogut aprendre de tots vosaltres.

Primer de tot, m'agradaria començar els agraïments pels meus directors de tesi Francina Munell i Jordi Barquineró. Gràcies per creure en mi i donar-me l'oportunitat de començar en el món de la recerca, guiar-me i portar-me fins aquí. Francina, gràcies per la feina que fas amb tots els pacients de neuromuscular i fer-la sempre amb empatia i un somriure. Jordi, gràcies per saber guiar-me i ensenyar-me a aprendre de cada un dels errors i superar els obstacles que ens posa la recerca. Ha estat un plaer poder aprendre i treballar al vostre costat. Gràcies per ser uns grans professionals però sobretot grans persones.

Moltes gràcies també a l'Alfons Macaya i la Belen Perez. Sou un pilar fonamental en el grup de Neurologia Pediàtrica i sense vosaltres tampoc seria possible tot això. Moltes gràcies per totes les vostres aportacions per a millorar la feina i compartit tot el vostre coneixement.

Ana Cazorro i Ainara, heu arribat a la última etapa però potser en unes de les més dures. Hem compartit llàgrimes i riures a parts iguals, però sense vosaltres no hagués estat possible finalitzar aquesta tesis. Els vostres ànims, abraçades i somriures són els que m'han fet possible continuar quan pensava que no era capaç de treure forces per continuar.

Anna Marcè, tu has sigut la constant al laboratori durant tota la meua tesi al laboratori. Gràcies per estar sempre disposada a donar-me la teua ajuda i el teu constant suport.

Laura Briansó, gràcies per la teua ajuda des de el primer moment al laboratori i després des del laboratori veí. Les llargues hores a la campana de cultiu serien molt més avorrides sense tu al costat.

Laura, Paula, Angela, Maria, Ares i tots els màsters que heu passat pel laboratori. Gràcies per venir amb tota l'energia i ganes d'aprendre. Gràcies per escoltar les llargues explicacions i la gran ajuda i implicació que totes heu tingut en aquest treball.

Marta i Rocio, tot i no haver compartit el laboratori si que hem compartit director de tesi. Moltes gràcies per la vostra ajuda i implicació, i per acollir-me com una més del vostre laboratori.

Tampoc em puc oblidar de Laura Costa i David Gomez, part molt important en la recerca clínica del grup de neuromuscular. Moltíssimes gràcies per ensenyar-me tant i fer tant fàcil el treballar amb vosaltres.

Aquesta tesi no hauria estat possible sense la generosa contribució de Rubén Hernández y Manuela González del grup de Recerca “Gene Therapy and Regulation of Gene Expression” de CIMA (Universidad de Navarra); Dr. Pau Sancho i Beatriz Aguilar del grup “Liver cell plasticity and tissue repair” del Hospital Clínic de Barcelona; Marc Güell i Avencia Sánchez-Mejías del grup “Translational Synthetic Biology” del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona.

ImpulsaT, gràcies per la vostra ajuda i per la vostra implicació en la recerca. Veure que el treball que fem dia a dia al laboratori us dona esperances es el que ens dona força i empenta per continuar.

Gràcies a totes les famílies involucrades en els assajos clínics de neuromuscular pediàtrica. Tot i no estar implicats directament en aquesta tesi, el vostre agraïment i energia es el que ens dóna forces a continuar en la recerca. Veure que el treball diari arriba a vosaltres i genera un impacte en la vida dels més petits es la millor recompensa al nostre treball.

Per últim vull agrair a la meva família i amics, gràcies pel vostre suport incondicional i els ànims en aquesta etapa de la meva vida. Mama i Papa, moltes gràcies per sempre estar quan us necessito ,per fer-me la persona que sóc, per creure sempre en mi fins i tot quan jo no hi creia, i sobretot per les vostres abraçades i petons. Iván, no puc agrair-te suficient el acompanyar-me en aquest camí. Gràcies per fer-me somriure cada dia i per fer-me costat en tot moment. Viure la vida en meme és més divertit, sobretot si és al teu costat.

Sovint s'escolta com les persones discapacitades som uns "herois" per viure una vida "normal" i no rendir-nos. Les persones que em coneixen saben que no sóc gaire fan de que s'atorgui aquest tipus d'adjectiu a les persones discapacitades, perquè nosaltres no fem res més que intentar viure la nostra vida i assolir les nostres metes, al igual que la resta de persones del nostre voltant. Jo crec i estic convençuda de que els veritable herois d'aquesta història son les mares, pares i persones que es troben al costat de nosaltres cada dia. Aquestes persones son les que en un primer moment es van veure sotmesos de sobte i sense preavis en una situació complicada de gestionar i en la que ningú s'hi planteja estar mai. Però a l'hora s'han de mostrar optimistes perquè la persona propera no decaigui i continuï lluitant. Sou els que ens doneu les ganes, l'esperança i ens acompanyeu al llarg de la nostra vida, ajudant-nos a superar els obstacles d'un mon que molt sovint no ho posa gens fàcil. Moltes gràcies per ser-hi i per continuar estant al meu costat.

Índex

Abreviatures.....	9
CAPÍTOL 1.....	11
1. Introducció.....	11
1.1. Múscul esquelètic. Estructura bàsica i organització del múscul esquelètic.....	11
1.2. Cultiu in vitro de múscul esquelètic humà.....	12
1.3. Distròfies Musculars.....	14
1.4. Distròfia Muscular de Duchenne.....	14
1.4.1. Introducció.....	14
1.4.2. Bases moleculars de la DMD: La Distrofina gen i proteïna.....	15
1.4.3. Tractament de la DMD.....	16
1.4.4. Teràpies read-through.....	17
1.4.5. Ataluren® (PTC124).....	17
1.4.6. RTC13 i RTC14.....	18
2. Hipòtesis i objectius.....	19
3. Material i mètodes.....	20
3.1. Cultius cel·lulars.....	20
3.1.1. Tècniques bàsiques de cultiu cel·lular.....	20
3.1.2. Descongelació i congelació.....	20
3.1.2.1. Tripsinització.....	20
3.1.2.2. Manteniment.....	21
3.1.2.3. Recompte cel·lular.....	21
3.1.3. Línies cel·lulars immortalsitzades.....	21
3.1.3.1. Condicions de cultiu.....	21
3.1.4. Cultiu primari de múscul esquelètic humà.....	22
3.1.4.1. Neteja de la biòpsia i etapa de pre-incubació (“clot”).....	22
3.1.4.2. Creixement de cèl·lules miogèniques a partir d’explants.....	23
3.1.4.3. Selecció mioblastes amb tècnica de pre-plating.....	24
3.1.4.4. Tècnica de diferenciació clàssica.....	24
3.1.4.5. Tècnica de diferenciació d’alta densitat de sembra.....	24
3.1.5. Cultius primari de múscul esquelètic murí.....	26
3.1.5.1. Obtenció de cèl·lules precursors mioblàstiques (MPCs) murines mitjançant digestió enzimàtica.....	26
3.1.5.2. Tècnica <i>Pre-plating</i> modificada.....	27

3.1.5.3.	Diferenciació de mioblastes de ratolí.....	27
3.2.	Tractaments	27
3.2.1.	Compostos amb activitat <i>read-through</i>	27
3.3.	Anàlisi de viabilitat cel·lular.....	28
3.4.	Anàlisi proteic.....	28
3.4.1.	Extracció de proteïnes.....	28
3.4.2.	Quantificació de proteïnes	28
3.4.3.	Anàlisi per electroforesi de proteïnes	29
3.4.3.1.	Preparació de les mostres.....	29
3.4.3.2.	Tècnica de Western blot	29
3.4.4.	Anàlisi per immunofluorescència	29
3.4.5.	Índex de fusió	30
3.5.	Anàlisi estadístic	30
4.	Resultats.....	31
4.1.	Plataforma in vitro muscular humana.....	31
4.1.1.	Purificació de cultiu primari humà	31
4.1.2.	Tècnica de diferenciació clàssica per privació de sèrum.....	32
4.1.3.	Tècnica de diferenciació d'alta densitat de sembra.....	33
4.2.	Cultiu primari de ratolí	37
4.2.1.	Obtenció de MPCs murines mitjançant digestió enzimàtica i tècnica de pre-plating modificada.....	37
4.2.2.	Diferenciació de MPCs.....	39
4.3.	Tractament amb fàrmacs <i>read-through</i>	40
4.3.1.	Citotoxicitat i viabilitat cel·lular.....	40
4.3.2.	Tractament amb PTC124 en cèl·lules primàries humanes diferenciades	41
4.3.3.	Tractament amb PTC124, RCT 13 i RTC 14 en cèl·lules primàries de ratolí	41
CAPÍTOL 2		43
1.	Introducció	43
1.1.	Distròfia Muscular Congènita tipus 1A (MDC1A)	43
1.2.	Biologia de les Laminines	43
1.3.	Patogènesi molecular de la MDC1A.....	44
1.4.	Models in vivo de MDC1A	45
1.5.	Teràpies per MDC1A	46
1.6.	Teràpia Gènica.....	47
1.7.	Vectors adenovirals.....	48
1.8.	El fetge com a diana terapèutica.....	49

2.	Hipòtesis i Objectius.....	50
3.	Material i mètodes.....	51
3.1.	Tractaments.....	51
3.1.1.	Proteïna recombinant.....	51
3.1.2.	Eines genètiques: Disseny i generació de plasmidis i vectors.....	51
3.1.2.1.	Disseny dels plasmidis.....	51
3.1.3.	Disseny i producció HC-AdV5.....	52
3.1.4.	Producció i aïllament plasmidi.....	52
3.1.5.	Restricció.....	53
3.2.	Cultius cel·lulars.....	53
3.2.1.	Cultius cel·lulars i manteniment.....	53
3.2.2.	Transfecció amb Lipofectamina.....	54
3.2.3.	Transducció amb AdV5.....	54
3.3.	Procediments animals.....	55
3.3.1.	Model murí.....	55
3.3.2.	Condicions d'habitatge i experimentació.....	55
3.3.3.	Injecció intraperitoneal de proteïna recombinant.....	55
3.3.4.	Injecció hidrodinàmica.....	56
3.3.5.	Injecció retro-orbital d'AdV.....	56
3.3.6.	Test funcionals.....	57
3.3.7.	Eutanasia i recollida de mostres.....	57
3.4.	Tècniques Generals.....	58
3.4.1.	Extracció genòmica d'ADN i ARN.....	58
3.4.1.1.	Cultiu cel·lular.....	58
3.4.1.2.	Teixit muscular i fetge.....	58
3.4.2.	Quantificació d'ADN i ARN.....	58
3.4.3.	Extracció de proteïna.....	59
3.4.4.	Precipitació proteïna.....	59
3.4.5.	Columna de purificació HisTag.....	59
3.4.6.	Quantificació Proteïnes.....	59
3.5.	Anàlisi Transcriptòmic.....	59
3.5.1.	Retrotranscripció (RT-PCR).....	59
3.5.2.	PCR a temps real (RT-qPCR).....	60
3.6.	Anàlisi genòmic.....	60
3.6.1.	PCR a temps real (RT-qPCR).....	60
3.7.	Anàlisi proteic.....	61

3.7.1.	Tècnica Western blot	61
3.7.2.	Immunohistoquímica	61
3.7.3.	Espectrofotometria de masses (MS)	62
3.7.3.1.	Preparació de mostres	62
3.7.3.2.	Digestió <i>in-gel</i>	62
3.7.3.3.	Cromatografia i anàlisi d'espectrofotometria de masses.....	63
3.7.3.4.	Identificació de proteïnes	63
3.8.	Anàlisi estadístic	63
4.	Resultats	64
4.1.	Expressió de L211rh en músculs de ratolins administrats sistèmicament.....	64
4.2.	Expressió de LAMA2, LAMB1 i LAMC1 en línies cel·lulars.....	66
4.3.	Expressió de LAMA2, LAMB1 i LAMC1 en hepatòcits primaris i organoides de fetge 68	
4.4.	Expressió de PD23-EAAT-LAMA2 i PD23-EAAT-LAMA-H <i>in vitro</i> en cèl·lules transfectades.....	69
4.5.	Expressió de PD23-EAAT-LAMA2 i PD23-EAAT-LAMA-HisTag <i>in vivo</i> en ratolins wt i Dy ^{2j/2j} 70	
4.6.	Quantificació de número de còpies genòmiques de LAMA2 a HC-Adv5	72
4.7.	Expressió de HCA-EAAT-LAMA2 i HCA-EAAT-LAMA2-H <i>in vitro</i>	73
4.8.	Expressió de laminina – $\alpha 2$ en fetge de ratolins tractats amb HC-Adv5 amb LAMA2 humana	73
4.9.	Expressió laminina – $\alpha 2$ en múscul de ratolí tractats amb HC-Adv5 amb LAMA2 humana	76
4.10.	Test funcionals	77
5.	Discussió	79
6.	Conclusions	89
	Bibliografia	90

Abreviatures

- 6MWT: de l'anglès, *6 minute walking test*
- ADN: àcid desoxiribonucleic
- APS: de l'anglès, *Ammonium Persulfate*
- ARNm: àcid ribonucleic missatger
- BSA: de l'anglès, *Bovine Serum Albumin*
- CK: de l'anglès, *Creatine Kinase*
- CTX: cardiotoxina, verí de cobra
- DGC: de l'anglès, *dystroglycan complex*
- DMD: Distròfia muscular de Duchenne
- DMSO: de l'anglès, *dimethyl Sulfoxide*
- ECM: Matriu extracel·lular
- FBS: de l'anglès, *Fetal Bovine Serum*
- FVC: capacitat vital forçada
- GAPDH: de l'anglès, *Gluceraldehyde-3-Phospate Dehydrogenase*
- GS: de l'anglès, *Goat Serum*
- GMG: gastrocnemi
- HBSS: de l'anglès, *Hank's Buffered Saline Solution*
- HC-AdV: de l'anglès, *high capacity adenoviral vectors*
- HC-AdV5: de l'anglès, *high capacity adenoviral vectors type 5*
- HDSS: de l'anglès, *High density seeding spot*
- HRP: peroxidasa de rave picant
- HV: de l'anglès, *Helper virus*
- LAMA2: de l'anglès, *Laminin subunit alpha 2*
- L211: laminina 211
- L211rh: laminina 211 recombinant humana
- O/N: de l'anglès, *overnight*
- MDC1A: de l'anglès, *merosin-deficient congenital muscular dystrophy type 1A*
- MDX: model murí de distròfia muscular de duchenne
- MPCs: de l'anglès, *myogenic precursor cells*
- PBS: de l'anglès, *Phosphate buffered saline*

PBS-T: de l'anglès, *Phosphate buffered saline with Tween*

PSF: de l'anglès, *penicillin, streptomycin and Fungizone*

qPCR: reacció en cadena de la polimerasa quantitativa

RTC13: de l'anglès, *Read-through compound 13*

RTC14: de l'anglès, *Read-through compound 14*

RT-PCR: reacció en cadena de la polimerasa amb transcripció inversa

TEMED: de l'anglès, *Tetramethylethylenediamine*

Wt: de l'anglès, *wild-type*

CAPÍTOL 1

1. Introducció

1.1. Múscul esquelètic. Estructura bàsica i organització del múscul esquelètic.

El múscul esquelètic és un teixit que presenta un alt grau d'organització estructural (Figura 1.1.). L'arquitectura del múscul està composta per milers de fibres musculars multinucleades (fibres musculars madures) que es distribueixen paral·lelament entre elles amb un diàmetre relativament consistent (Lieber, 2011). El múscul es troba envoltat d'una capa de teixit connectiu anomenat epimisi. Dins del múscul les fibres musculars s'ordenen en paquets anomenats fascicles que es troben envoltats per teixit conjuntiu anomenat perimisi. Alhora, cada fibra muscular està envoltada per una membrana cel·lular o sarcolema i per un teixit conjuntiu col·lagenós anomenat endomisi (Gillies and Lieber, 2011).

Cada fibra muscular està densament compactada amb miofibril·les al seu interior i els orgànuls com el nucli i les mitocondries estan localitzats en la perifèria de les fibres musculars madures (Greising *et al.*, 2012). Les miofibril·les estan formades per unitats contràctils repetitives anomenades sarcòmers, que formen la base de la contracció i la força muscular (Lieber, 2011).

L'estructura del sarcòmer es compon principalment de dues proteïnes, actina i miosina, organitzades de manera precisa. La disposició de l'actina i la miosina dins dels sarcòmers dona lloc a una banda isòtropa lleugera (I) on resideixen filaments primers compostos principalment, per una banda anisotròpica fosca (A) on es troben els filaments gruixuts compostos de miosina i una regió anomenada zona H, on es superposen els filaments primers i gruixuts donant lloc a la secció més fosca del sarcòmer (Et and Acta, 1953; Hanson and Huxley H.E, 1953).

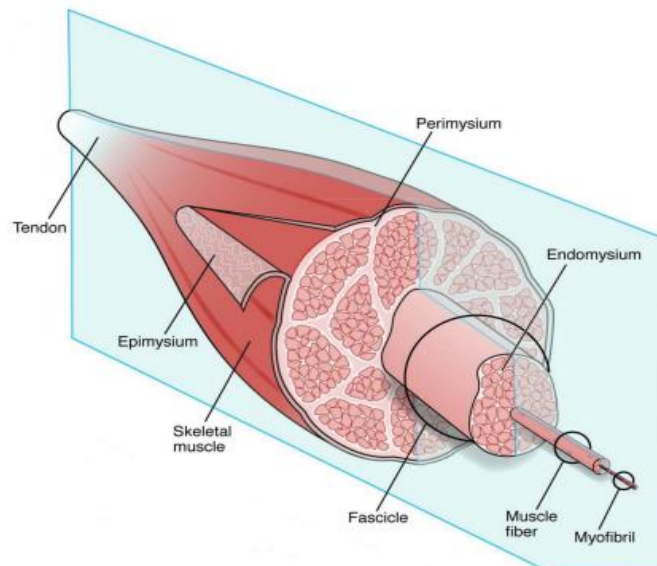


Figura 1.1. Estructura del múscul esquelètic humà (Gillies and Lieber, 2011).

El sarcòmer conté altres proteïnes estructurals, com la titina i la nebulina, que contribueixen a la integritat i l'estabilitat del sarcòmer, influeixen en la tensió passiva i les característiques de rigidesa de les cèl·lules individuals i poder ser rellevants per la senyalització cel·lular (Lieber, 2011).

La innervació del múscul esquelètic per motoneurons és essencial per a que el múscul esquelètic porti a terme la seva funció. Les motoneurons alfa són les encarregades de la senyalització a les fibres musculars i l'estimulació de la contracció muscular mitjançant la transmissió del potencial d'acció. Una motoneurona és capaç de innervar més d'una fibra muscular a l'hora. Una unitat motora es defineix com la motoneurona i les nombroses fibres musculars innervades per aquesta (Lieber, 2011).

El múscul esquelètic es troba molt vascularitzat, ja que l'activitat contràctil d'aquest depèn de la utilització de substrat que s'allibera pel sistema circulatori. A més, és per on es realitza el subministrament d'oxigen i l'eliminació de subproductes metabòlics del teixit (Lieber, 2011).

La matriu extracel·lular del múscul esquelètic (ECM) té un paper important en la transmissió, manteniment i reparació de la força de la fibra muscular. El principal component de teixit connectiu que engloba el múscul esquelètic és el col·lagen, que representa fins a un 10% de la massa seca muscular. En menys quantitat, hi ha un gran nombre de proteïnes que també contribueixen a la funció i integritat de l'estructura de la matriu extracel·lular com poden ser les laminines i les fibronectines (Gillies and Lieber, 2011).

L'ECM proporciona suport a les proteïnes musculars que l'envolten, i també és essencial per a la transmissió de la força contràctil, ja que connecta el múscul amb el tendó. Com a tal, l'adhesió de les fibres musculars a l'ECM és de gran importància per a l'estructura i la funció normal del múscul. Aquesta adhesió s'aconsegueix principalment per les integrines i complexos distrofina-distroglíca. Les integrines són receptors que es troben al sarcolemma de les fibres del múscul esquelètic i uneixen intracel·lularment el citoesquelet amb l'ECM. El complex distrofina – distroglíca també connecta el citoesquelet amb l'ECM. La distrofina és una proteïna intracel·lular que s'uneix a β -distroglíca i a α -distroglíca que, alhora s'uneixen a les subunitats de laminines. Els defectes en qualsevol proteïna dins d'aquest complex dona lloc a una distròfia muscular, que es manifesta amb debilitat muscular (Lieber, 2011),(Gillies and Lieber, 2011).

1.2. Cultiu *in vitro* de múscul esquelètic humà

Durant segles, els animals i els teixits d'origen animal han estat les principals eines per entendre els sistemes biològics, les malalties humanes, el desenvolupament d'estratègies terapèutiques i el cribratge de fàrmacs. Tanmateix, traslladar les dades d'animals a aplicacions clíniques ha estat problemàtic i ha fet que de vegades s'aprovin menys teràpies o augmenti el cost en el procés de desenvolupament d'aquestes. El següent pas lògic per millorar la translació entre la investigació clínica i l'aplicació al pacient és definir sistemes *in vitro* funcionals basats en teixit i/o cèl·lules humanes en medis definits (Guo *et al.*, 2011).

Els cultius cel·lulars són una plataforma tècnica molt utilitzada en investigació biomèdica, ja que permet l'anàlisi de funcions específiques cel·lulars que poden relacionar-se amb canvis en determinats estats de malaltia a escala cel·lular. S'han establert diferents models de cultius cel·lulars que inclouen línies cel·lulars immortalitzades que es repliquen indefinidament *in vitro* i conserven la capacitat de diferenciar-se, i de cèl·lules primàries que es poden aïllar directament del teixit hoste i créixer o mantenir-se en cultiu. Tanmateix, les cèl·lules primàries tenen un potencial replicatiu limitat i es tornen senescents després d'alguns passos. Les cèl·lules primàries humanes proporcionen beneficis addicionals en la investigació, en comparació amb les línies cel·lulars immortalitzades, ja que s'ha demostrat que els cultius primaris conserven les

característiques metabòliques del donant de teixit i reflecteixen millor les alteracions associades a la malaltia (Cornall *et al.*, 2015)

Un model *in vitro* molt utilitzat per a la generació de teixit muscular esquelètic funcional és la línia cel·lular immortalitzada murina C2C12 (Ostrovidov *et al.*, 2014). S'ha utilitzat en una gran quantitat d'estudis degut a la seva fàcil accessibilitat i a que les condicions de cultiu i diferenciació estan bé definides. Tot i que les cèl·lules C2C12 han proporcionat informació inestimable en aquests estudis i en els passos claus per a la diferenciació *in vitro*, treballar amb múscul esquelètic primari humà té avantatges que s'expliquen a continuació (Cheng *et al.*, 2014).

Els cultius cel·lulars de múscul esquelètic humà són eines molt valuoses per l'estudi del desenvolupament muscular, malalties i tractaments. S'han desenvolupat múltiples sistemes de cultiu que solen utilitzar cèl·lules satèl·lits aïllades de donants sans o d'individus amb malalties rellevants. Les condicions per la proliferació d'aquestes cèl·lules precursoras musculars estan ben establertes i són crítiques per al creixement i la seva posterior diferenciació (Guo *et al.*, 2014).

La diferenciació de mioblastes a miotubs madurs és fonamental per l'estudi dels efectes de les miopaties i algunes malalties metabòliques sistèmiques sobre l'estructura i la funció del múscul esquelètic, la regeneració i la renovació dels teixits amb finalitats d'enginyeria de teixits, teràpia gènica i com a plataforma per assajar fàrmacs (Guo *et al.*, 2014), (Cornall *et al.*, 2015). Els sistemes musculars humans *in vitro* publicats fins el moment han demostrat una capacitat de diferenciació limitades (Guo *et al.*, 2014), (Stern-Straeter *et al.*, 2008).

En condicions fisiològiques, el desenvolupament del múscul esquelètic comença amb la fusió de mioblastes mononucleats per formar miotubs multinucleats madurs (Li *et al.*, 2013; Chal and Pourquié, 2017). De la mateixa manera, *in vitro*, les MPCs han de proliferar, alinear-se i fusionar-se per formar miotubs madurs allargats multinucleats. Fins ara, cap dels mètodes de cultiu tradicionals ha permès el creixement del teixit muscular esquelètic amb totes aquestes característiques. Les limitacions notables de les metodologies anteriors són: que la diferenciació generalment s'indueix per la privació de sèrum cosa que provoca una disminució de la viabilitat cel·lular; que l'alineació de les cèl·lules es veu afectada per procediments que requereixen temps que impliquen l'ús de substrats costosos, complexos i amb patrons en miniatura (*micropatterns*); i que la contracció espontània és un esdeveniment aleatori i rar (Models, 2013).

Els miotubs adults no són capaços de realitzar divisions mitòtiques i, per tant, els sistemes primaris de cultius de múscul esquelètic depenen de la capacitat d'induir l'activació i la posterior diferenciació miogènica de cèl·lules satèl·lits quiescents des de la fibra muscular. A diferència de les línies cel·lulars immortalitzades, un cop aïllades, els cultius de músculs esquelètics primaris evolucionen cap a la senescència i deixen de proliferar després d'un període de temps relativament curt. Tanmateix, les cèl·lules primàries conserven els trets fenotípics de les cèl·lules donants, i es poden cultivar a partir de petites mostres de múscul d'aproximadament 50 mg per contrarestar aquesta limitació (Cornall *et al.*, 2015).

1.3. Distròfies Musculars

Les distròfies musculars són un conjunt heterogeni de malalties primàries del múscul causades per mutacions deletèries en més de 60 gens (Cohen *et al.*, 2021)], i clínicament es caracteritzen per debilitat muscular i atrofia muscular progressiva (Mercuri, Bönnemann and Muntoni, 2019).

Els símptomes poden ser molt diversos segons el grup de músculs i òrgans implicats. La severitat, edat d'inici, prognosi i grup de músculs i òrgans afectats, varien molt en les diferents formes de la malaltia. Totes, però comparteixen característiques patològiques en biòpsies musculars on s'observen fibres musculars en fase de necrosi, regeneració i reemplaçament de fibres musculars per teixit adipós i connectiu (Kinter and Sinnreich, 2014; Mercuri, Bönnemann and Muntoni, 2019).

Les distròfies musculars són causades per mutacions en gens que codifiquen per proteïnes musculars. En la majoria de casos es tracta de proteïnes estructurals que donen suport al múscul esquelètic. En altres, poden participar en la reparació de la membrana muscular, en l'organització interna de les fibres musculars, proteïnes de l'aparell contràctil o enzims i proteïnes nuclears (Kinter and Sinnreich, 2014). Aquestes mutacions, en la majoria de casos, provoquen una disfunció o falta de proteïnes essencials per a l'estabilitat de la cèl·lula muscular provocant una destrucció progressiva i debilitat del múscul (Mercuri, Bönnemann and Muntoni, 2019).

1.4. Distròfia Muscular de Duchenne

1.4.1. Introducció

La Distròfia muscular de Duchenne (DMD) és la forma més severa i comú de distròfia muscular diagnosticada en la infància, afectant aproximadament 1 de cada 3.500 nounats (homes)]. Un petit subgrup de pacients es classifica com a distròfia muscular de Becker (BMD), que és una forma fenotípicament més lleu i que, habitualment s'associa amb una manifestació més tardana dels símptomes i una progressió més lenta de la malaltia. La DMD és causada per mutacions (principalment delecions) en el gen de la distrofina (DMD; locus Xp21.2), el que ocasiona l'absència, disminució o defecte funcional de la proteïna distrofina i causa la degeneració progressiva dels músculs (Le, Winder and Hubert, 2010; Blat and Blat, 2015). La malaltia es diagnostica, en la majoria dels casos, a la primera infància, entre els 3 i 5 anys de vida, moment en el qual es comencen a veure deficiències en la motricitat dels afectats o prèviament per la identificació d'una elevació de creatina cinasa (CK) en una analítica sanguínia (Guiraud *et al.*, 2010; Blat and Blat, 2015). Aquestes deficiències motores es manifesten com a dificultat per pujar escales, córrer o saltar i aixecar-se del terra utilitzant la maniobra de Gower reflectint la debilitat muscular predominant en malucs i extremitats inferiors. També poden presentar retard cognitiu, retard en el llenguatge i en casos rars trastorns de l'espectre autista. (Kinter and Sinnreich, 2014). Amb la progressió de la malaltia, el pacient perd la capacitat d'ambulació al voltant dels 10-15 anys, adquirint dependència a cadira de rodes. Amb el pas del temps presenta insuficiència respiratòries per afectació diafragmàtica i complicacions ortopèdiques i cardíques (Jane T.Seto, Niclas E. Bengsston, 2014; Blat and Blat, 2015). Encara que la DMD és una malaltia multisistèmica, la característica més òbvia és la degeneració progressiva i la debilitat del múscul esquelètic que conduirà cap a una discapacitat física severa i una mort prematura. Actualment no hi ha cura per aquesta malaltia, i lamentablement, tot i l'atenció mèdica específica, la majoria de pacients amb DMD no sobreviuen més enllà de la tercera dècada de vida. La patogenicitat de la malaltia de Duchenne és complexa. Encara que durant el primer any de vida no es presentin

síntomes, ja hi ha degeneració de les miofibril·les de les cèl·lules musculars i, a diferència del que succeeix en els nens sans, les cèl·lules musculars deteriorades no poden ser reemplaçades per cèl·lules satèl·lit miogèniques després dels primers quatre anys de vida; aquestes cèl·lules satèl·lit sembla que perden la seva capacitat de replicar-se després de només unes 10 divisions mitòtiques. Hi ha una falla regulatòria de les cèl·lules satèl·lit per mecanismes que encara no es coneixen amb prou detall (Birnkrant *et al.*, 2018; Chunkayeva and Jaxybayeva, 2021).

1.4.2. Bases moleculars de la DMD: La Distrofina gen i proteïna

El gen de la distrofina (locus Xp21.2) és un dels més grans descrits en el genoma. S'estén per $2,3 \times 10^6$ parells de bases que inclouen 79 exons, resultant en un mRNA madur de 1400 pb que codifica per una proteïna de 427 kDa (Blat and Blat, 2015). A causa de la seva mida, la taxa de mutació pel gen és alta comparada amb la taxa de mutació mitjana estimada en els éssers humans ($1 \cdot 10^{-4}$ vs $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ per gens humans). Una tercera part de totes les mutacions de DMD són *de novo* i de diferents tipus (Aartsma-rus, Deutekom and Fokkema, 2006; McMahon, Zijl and Gilad, 2015). L'espectre mutacional en pacients amb DMD inclou delecions (~ 65%), duplicacions (~ 7%) d'un o més exons, petites insercions o delecions d'un exó (~ 7%), mutacions puntuals en un sol nucleòtid (~ 20%), mutacions que afectin a llocs d'*splicing* o intròniques (>1%) (Aartsma-rus, Deutekom and Fokkema, 2006).

Hi ha dos *hotspots* mutacionals: un "*hotspot* major", que engloba els exons 45 al 53, i un "*hotspot* menor", que engloba els exons 2 al 20. Les mutacions en DMD usualment interrompen el marc de lectura, mentre que les mutacions en BMD conserven el marc de lectura, generant una proteïna de menor mida amb suficient activitat biològica per a donar un fenotip menys agressiu que en la DMD (Le, Winder and Hubert, 2010).

La Distrofina és una proteïna del citoesquelet important per l'estabilitat de la cèl·lula muscular, composta per quatre regions o dominis principals: domini aminoterminal, domini central, domini ric en cisteïna i el domini carboxi-terminal. El domini amino-terminal, de 240 aminoàcids, té una alta homologia amb les α -actinines de manera que pot unir-se a la proteïna essencial de les miofibril·les i del citoesquelet, l'actina. El domini central constitueix l'eix de la molècula mitjançant 24 repeticions triple-helix tipus espectrina intercalades amb dos dominis "frontissa" rics en prolina, que proporciona elasticitat a l'estructura (Cheng *et al.*, 2014). El domini ric en cisteïna és similar a la regió carboxiterminal de la α -actinina. Finalment, el carboxiterminal, molt específic, és l'encarregat d'unir-se a glicoproteïnes de membrana. Per tant, la Distrofina és una proteïna allargada i amb forma de cordó, que pel seu extrem NH_2 s'uneix amb l'actina citoplasmàtica i pel seu extrem COOH amb la membrana (sarcolema), a través de glicoproteïnes de membrana (Le, Winder and Hubert, 2010).

La funció de la Distrofina és proporcionar un vincle entre els filaments d'actina, component de l'aparell contràctil de la cèl·lula muscular, el citoesquelet, i altres proteïnes citoplasmàtiques que estan integrades en el sarcolemma, formant així un complex glicoproteic anomenat "complex de glicoproteïnes associades a Distrofina" (DGC). El DGC ofereix un vincle entre el citoesquelet i la matriu extracel·lular, i funciona com un amortidor que permet al sarcolemma mantenir la integritat estructural durant l'estrès mecànic que es produeix durant la contracció muscular (Blat and Blat, 2015) (Veure Figura 1.2.).

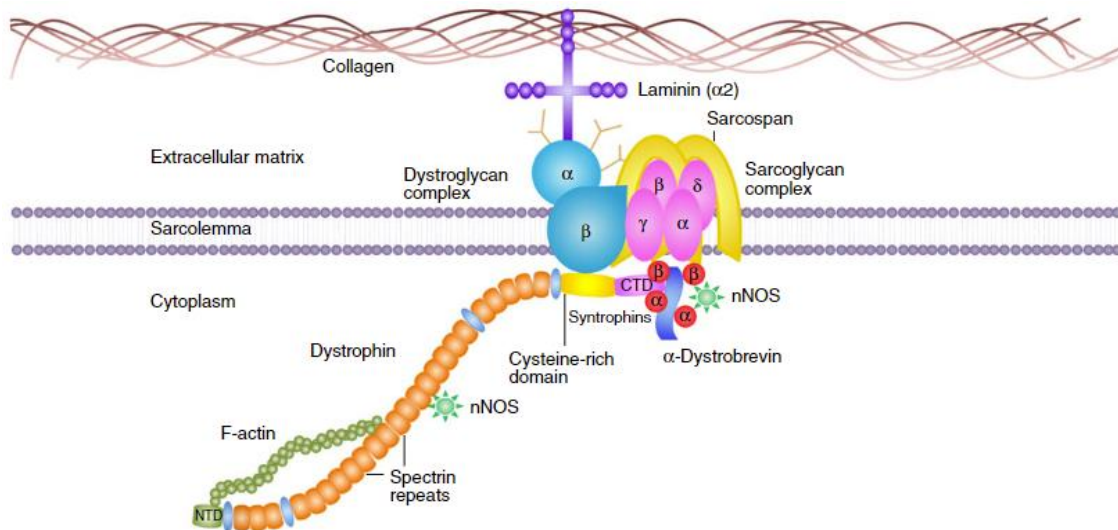


Figura 1.2. Esquema de complex DGC muscular (Guiraud *et al.*, 2015)

En pacients amb DMD, la pèrdua de Distrofina provoca una cascada d'esdeveniments patològics que en última instància causen la degeneració de la fibra muscular. Amb el pas del temps, el procés degeneratiu col·lapsa la capacitat de regeneració de múscul i les fibres musculars són gradualment reemplaçades per col·lagen, fibroblasts i dipòsits de greix. A causa de la disminució de fibres musculars funcionals, la capacitat contràctil del múscul decreix i conjuntament amb la inflamació de múscul estimulada per la necrosi, causen la debilitat muscular (Blat and Blat, 2015).

1.4.3. Tractament de la DMD

Actualment, no hi ha cap tractament curatiu per la DMD. Hi ha algunes estratègies farmacològiques, com els glucocorticoides, que redueixen i alenteixen els símptomes associats a la musculatura del tronc, extremitats, respiratòria i cardíaca. Però són només parcialment efectives i el seu ús crònic provoca efectes secundaris importants (Rebecca J. *et al.*, 2013; Blat and Blat, 2015; Guiraud *et al.*, 2015). Per tant, és necessari desenvolupar teràpies més eficaces per millorar la qualitat de vida i la supervivència dels pacients amb DMD (Blat and Blat, 2015). En les últimes dècades, s'han explorat nombroses estratègies per a tractar la DMD tant en el món acadèmic com per part de la indústria. Algunes de les teràpies més avançades que s'estan estudiant inclouen teràpia gènica usant vectors virals, teràpies amb cèl·lules mare (transferència de mioblastes o altres tipus cel·lulars), restauració de l'expressió de proteïna mitjançant mètodes d'*exon skipping* o fàrmacs amb activitat *read-through*, o expressió d'una proteïna compensatòria com pot ser la utrofina (Muntoni *et al.*, 2022).

Hi ha nombrosos assaigs clínics en pacients amb DMD. El repte per als fàrmacs que pretenguin ser curatius és que siguin capaços d'arribar a tots els músculs del cos (que representen un ~ 35% de la massa corporal), i restablir la funció de la Distrofina tant en múscul esquelètic, diafragma, cor, i idòniament també en cervell (Rebecca J. *et al.*, 2013).

1.4.4. Teràpies read-through

Entre els nombrosos tractaments en fase d'assaig clínic, uns dels més prometedors són els que tracten amb molècules que restauren l'expressió de la Distrofina modificant les mutacions que causen aquesta malaltia. En aproximadament un 15% dels pacients amb DMD les mutacions causants de la malaltia són les denominades mutacions "nonsense" o sense sentit, que originen un codó stop derivat del triplet on te lloc la mutació (Rebecca J. *et al.*, 2013). Podem diferenciar tres tipus de mutacions nonsense segons el codó STOP que es trobi a l'RNAm: UAG ("ambar"), UGA ("opal"), i UAA ("core). Degut a aquest codó STOP prematur, durant la traducció del RNAm, el ribosoma allibera el pèptid naixent ocasionant una proteïna truncada. L'RNAm també podria ser degradat degut a NMD (Aartsma-rus *et al.*, 2003).

L'estratègia dels fàrmacs *read-through* consisteix en pertorbar el correcte funcionament del ribosoma, conduint a la introducció d'un aminoàcid (no necessàriament el correcte) en el lloc del codó stop prematur durant la translació, donant així una proteïna de longitud completa. El nucleòtid contigu al codó STOP prematur és rellevant per com la mutació *nonsense* serà interpretada pel ribosoma (Guiraud *et al.*, 2010; Rebecca J. *et al.*, 2013). Una mutació *nonsense* amb un codó STOP UGA sembla ser més permissiu, en estudis *in vitro*, mentre que el codó UAA és el menys permissiu. Aquestes observacions han suggerit que les drogues que suprimeixen les mutacions *nonsense* poden promoure un major nivell de *read-through* mitjançant l'explotació d'aquesta tendència que ja té el múscul dels pacients de forma natural, però només en fibres aïllades, i generar una proteïna funcional (o parcialment funcional) de longitud completa (Aartsma-rus *et al.*, 2010).

La quantitat mínima de Distrofina que es requereix per a arribar a una estabilitat muscular funcional normal es troba entre el 29% i el 57% segons diversos estudis. Aquests nivells de Distrofina són suficients per a mostrar un fenotip d'un múscul esquelètic aparentment sense debilitat (Neri *et al.*, 2007).

Una de les primeres molècules estudiades que van demostrar tenir activitat *read-through* van ser els antibiòtics aminoglicosídics, en concret la gentamicina. Els bons resultats obtinguts en els estudis preclínics en el model murí (mdx) (Barton-davis *et al.*, 1999) van conduir a assaigs clínics amb pacients portadors de mutacions *nonsense*. Com a objectiu es va establir l'augment dels nivells de Distrofina: aquesta va augmentar fins a un 13 i un 15%. La força muscular es va estabilitzar i es va arribar a un modest increment de la capacitat vital forçada (FVC). Encara que aquest estudi va demostrar el potencial terapèutic de la gentamicina, serien necessàries dosis més altes per a millorar encara més els resultats funcionals. A causa de la toxicitat renal i ótica dels aminoglicosídics, les limitacions potencials de l'administració intravenosa i la poca especificitat dels codons STOP prematurs, cal sumar esforços per tal d'identificar altres agents amb activitat *read-through* més efectius, segurs i específics (Mendell *et al.*, 2013).

1.4.5. Ataluren® (PTC124)

PTC124, conegut com a marca comercial Ataluren®, va ser identificat per *PTC Therapeutics* en un programa de detecció de fàrmacs d'alt rendiment dissenyat per identificar compostos que induïen específicament *read-through* ribosomal. Es van testar més de 500.000 compostos a partir d'una biblioteca química que van ser analitzats amb sistemes cel·lulars i amb sistemes lliures de cèl·lules. L'objectiu era trobar petites molècules que es poguessin administrar per via oral, que tinguessin propietats farmacocinètiques favorables i un perfil de seguretat adequat. Es van realitzar estudis preclínics que van demostrar l'activitat *read-through* mitjançant

experiments *in vitro* en diferents preparacions cel·lulars modificades per a tenir diferents codons de STOP prematurs, així com en miotubs de ratolins mdx i miotubs derivats de biòpsies musculars de pacients (Welch *et al.*, 2007; Haas *et al.*, 2015).]. D'aquests estudis preclínic *in vitro* se'n van extreure resultats positius i això va conduir a la realització d'assaigs clínics en humans. Els resultats preliminars d'aquests assaigs no van demostrar l'increment esperat de Distrofina ni una millora clínica evident. Tot i que els autors expliquen que hi ha hagut un augment de Distrofina en els músculs de la majoria de pacients, no s'han presentat anàlisis quantitatives clares a la fase IIa de l'estudi clínic (Barton-davis *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2009). El criteri de valoració clínica d'aquests assaigs ha estat la prova de marxa de 6 minuts (6MWT) que és una prova estandarditzada. Les dades extretes de la setmana 48 de la fase IIb de l'assaig clínic indiquen que els pacients tractats van caminar una mitjana de 30 metres més que els pacients tractats amb placebo. Tot i que l'avaluació de la Distrofina es va establir com a variable exploratòria, no s'ha informat de cap correlació entre els resultats de 6MWT i els nivells d'expressió de Distrofina (Rebecca J. *et al.*, 2013). A causa de les incerteses sobre l'efecte beneficiós, i com a condició per a l'aprovació final d'aquest tractament per a pacients amb DMD, s'està realitzant la fase d'extensió de l'assaig clínic. Es preveu tenir els resultats d'aquest a finals de 2015 (Muntoni *et al.*, 2022).

1.4.6. RTC13 i RTC14

Mitjançant un mètode HTS (*high-throughput screen*) sensible i quantitatiu desenvolupat per Du *et al.* es va realitzar un cribatge d'aproximadament 34.000 compostos de baix pes molecular amb potencial activitat *read-through*. Aquest procediment va donar lloc a la identificació de l'RTC13 i RTC14. Els primers assaigs que es van dur a terme per analitzar aquesta possible capacitat *read-through*, van demostrar activitat biològica en diferents línies cel·lulars de limfoblasts derivades de pacients amb atàxia-telangiectàsia que contenen cada un dels tres tipus de mutacions *nonsense*. I també es va demostrar la seva capacitat de restaurar la expressió de Distrofina en cèl·lules de ratolins mdx en cultiu. Per tant, aquests compostos tenen activitat *read-through* per diferents tipus de proteïnes i en més d'una espècie i llinatge cel·lular, i la seva activitat és independent de la ubicació del codó STOP prematur en el mRNA. En un intent d'avaluar el potencial d'aquests compostos pel tractament de la DMD, es va provar la capacitat de restaurar l'expressió de Distrofina en el múscul esquelètic de ratolins mdx. Les injeccions intramusculars d'RTC13 van promoure *read-through* en el codó stop UAA més eficientment que la gentamicina, PTC124 o RTC 14. L'administració sistèmica de RTC13 va restaurar la Distrofina en tots els grups musculars, incloent-hi el diafragma i el cor. Els nivells de Distrofina van ser significativament majors que els que es va assolir amb PTC124, i això es va associar a un augment significatiu de la força muscular i a una disminució en els nivells de CK, marcador de dany muscular. Aquests resultats apuntaven a RTC13 com a candidat per al tractament de la DMD (Du *et al.*, 2009).

2. Hipòtesis i objectius

La Distrofia Muscular de Duchenne és una malaltia devastadora y progressiva que actualment no disposa de cap tractament curatiu i només es poden oferir teràpies pal·liatives. En els últims anys s'han desenvolupat noves teràpies destinades a restablir l'expressió de la Distrofina, entre elles les dirigides a corregir les mutacions sense sentit amb fàrmacs amb activitat *read through* com son PTC124 (ataluren) i RTC3 i RTC14. Els resultats dels assaigs clínics de PTC124 en pacients amb DMD demostren un gran variabilitat de resposta i posen en dubte l'eficiència del tractament restaurador de la Distrofina i suggereixen que factor genètics (tipus i posició en l'ARN del codó STOP) i/o direccionalment del fàrmac al múscul podrien ser responsables d'aquesta variabilitat. L'anàlisi de la resposta *in vitro* a aquest tipus de teràpies en múscul humà provinent de pacients amb diferents mutacions sense sentit podria contribuir a conèixer la seva eficàcia. Per tal de poder testar l'eficàcia de nous fàrmacs emergents cal disposar de plataformes *in vitro* d'aquestes patologies que siguin robustes i de fàcil replicació.

Les hipòtesis principals que abordarem en aquest treball són les següents:

H1) Les cèl·lules musculars humanes es poden aïllar a partir de una biòpsia de múscul esquelètic i posteriorment cultivar-se i assolir un alt grau de diferenciació mitjançant tècniques no convencionals, aconseguint millorar els models *in vitro* de múscul esquelètic existents a l'actualitat.

H2) El tractament amb fàrmacs amb activitat *read-through* és capaç d'aconseguir un augment de Distrofina *in vitro* en cèl·lules musculars provinent del model murí de la malaltia i de pacients amb DMD.

Els principals objectius són:

O1) Aïllar, seleccionar i expandir de mioblastes de models de distrofia muscular de Duchenne murins i humans.

O2) Posar a punt i millorar tècniques de diferenciació de mioblastes primaris murins i humans.

O3) Testar compostos amb activitat *read-through* en mioblastes murins i humans.

3. Material i mètodes

3.1. Cultius cel·lulars

3.1.1. Tècniques bàsiques de cultiu cel·lular

Aquestes tècniques s'utilitzen de la mateixa manera per a tots els tipus cel·lulars que s'exploraran a continuació d'aquest apartat.

Tots els cultius es van portar a terme fent servir una cabina de seguretat biològica de classe II en condicions estèrils. Les cèl·lules es van cultivar a 37°C i 5% CO₂ en un incubador.

3.1.2. Descongelació i congelació

Per l'emmagatzematge a llarg termini els vials de cèl·lules es van mantenir en dipòsits de nitrogen líquid a -196 °C.

Per la descongelació, un cop extret el vial del nitrogen líquid, es van submergir ràpidament a un bany a 37 °C fins que es van començar a descongelar. A continuació, el tub es va transportar a la campana de bioseguretat i es va afegir el medi de creixement complet lentament fins que les cèl·lules es van descongelar per complet. Finalment, les cèl·lules es van centrifugar 5 minuts a 1500 rpm, el sobrenedant es va descartar i el pellet cel·lular es va resuspendre amb medi de creixement complet fresc i les cèl·lules es van cultivar en un flascó T75.

El procés de congelació va consistir a recollir les cèl·lules i centrifugar-les a 1500 rpm durant 5 minuts. Els sobrenedants es van descartar i el pellet es va tornar a resuspendre amb medi de creixement fresc complementat amb 10% sèrum fetal boví (FBS; en anglès fetal bovine serum)(Biowest) i 10% de dimetil sulfòxid (DMSO; de l'anglès Dimethyl Sulfoxide)(D8418, Sigma-Aldrich). Aquest últim reactiu és un crioprotector que minimitza el dany cel·lular durant la congelació. Aquestes cèl·lules es van introduir en vials de congelació i es van guardar en contenidors de congelació Mr. Frosty (5100, Thermo Scientific) amb isopropanol (Merck) a -80 °C. Passades 24-48 hores els vials van ser emmagatzemats en nitrogen líquid.

3.1.2.1. Tripsinització

Les línies cel·lulars utilitzades en aquest treball són cèl·lules adherents, i per això la tripsinització és necessària per a la seva recol·lecció.

Per dur a terme la tripsinització, les cèl·lules es van rentar amb una solució salina HBSS sense calci ni magnesi (Biowest), i posteriorment es van afegir 3 ml per placa de 10 mm de diàmetre de solució de tripsina 0,3% (Biowest, 1x) i es van incubar les plaques durant 3-4 minuts a l'incubador a 37°C i 5% CO₂. Es va comprovar que les cèl·lules estaven desenganxades de la placa i es van afegir 5-6 ml de medi HBSS (Biowest) per detenir l'acció de la tripsina, i es van traspasar les cèl·lules a tubs estèrils per centrifugar (100xg en 5 minuts, a temperatura ambient). Després de la centrifugació, es van resuspendre en medi de creixement complet i es van sembrar en plaques de cultiu a una densitat aproximada de 12000 cèl·lules/cm².

3.1.2.2. Manteniment

Per a poder realitzar els experiments d'aquest treball és necessari mantenir les línies cel·lulars en cultiu de manera continuada. Per aquest motiu, les cèl·lules es van mantenir en 15 ml de medi complet en flascons T75. Quan es necessiten per a l'experimentació, una fracció d'aquestes cèl·lules es van passar i es van sembrar en diferents plaques multi-pous de mides específiques depenent de les necessitats experimentals.

Les línies cel·lulars cultivades en condicions òptimes es van dividir contínuament, pel que el seu manteniment implica una freqüència de renovació de medi de creixement, així com dividir-les i subcultivarles periòdicament. La freqüència de canvi de medi i el subcultiu es determina segons la taxa de creixement de la línia cel·lular i el factor de dilució utilitzat en el subcultiu va ser diferent per a cada tipus cel·lular.

3.1.2.3. Recompte cel·lular

Els diferents experiments portats a terme amb les diferents línies cel·lulars han de ser reproduïbles, de manera que les cèl·lules sempre es cultiven a una densitat específica. Per determinar el número de cèl·lules es van quantificar les cèl·lules recollides mitjançant una càmera de recompte Neubauer.

La fracció cel·lular recollida mitjançant tripsinització es va diluir amb solució salina tamponada de fosfat 1x (PBS; de l'anglès, *Phosphate buffered saline*). El factor de dilució es determina empíricament. Després d'aquesta dilució es va barrejar amb blau tripà (Sigma-Aldrich) en una proporció de volum 1:1. El blau de tripà permet la determinació de les cèl·lules mortes. La barreja final es va carregar a la cambra de Neubauer i les cèl·lules es van comptar amb un microscopi invertit. Es va fer el recompte de 4 quadrants i es va aplicar la següent fórmula:

$$\text{Concentració cel·lular} \left(\frac{\text{cel}}{\text{ml}} \right) = \left(\frac{\sum \text{Número de cèl·lules quadrant}}{4} \right) \times \text{Factor dilució} \times 10000$$

El nombre de cèl·lules observades per quadrant ha d'estar entre 30-300 cèl·lules, en cas contrari s'ha d'ajustar la dilució.

La majoria dels experiments van requerir al voltant del 80-90% de confluència cel·lular l'endemà de la sembra. Per tant el número de cèl·lules adequat es va determinar empíricament abans de realitzar els experiments. Hi ha dos factors determinants que influeixen densitat cel·lular que s'han de tenir en consideració: superfície de la placa multipou o flascó i el tipus de línia cel·lular

3.1.3. Línies cel·lulars immortalitzades

Es va utilitzar la línia C2C12 que és una línia cel·lular immortalitzada de mioblastes de ratolí. És un subclon de mioblastes obtinguts per Yaffe i Saxel a partir de múscul de la cama d'un ratolí C3H adult (Yaffe, David; Saxel, 1977).

3.1.3.1. Condicions de cultiu

Les cèl·lules C2C12 es van cultivar en medi de creixement complet que consisteix en DMEM (Biowest) suplementat amb 10% FBS (Biowest) i 1% Penicil·lina/Estreptomicina/Fungizone (PSF; en anglès Penicillin/Streptomycin/Fungizone) (Biowest).

3.1.4. Cultiu primari de múscul esquelètic humà

La tècnica utilitzada per l'obtenció de fibres musculars a partir de biòpsies, és la de explant-reexplant descrita per Askanas i Engel en 1975 [37], amb les modificacions introduïdes per Askanas i Gallez-Hawkins [38].

La preparació de cultius primaris de múscul humà es va iniciar a partir de biòpsies de teixit muscular esquelètic, principalment dels músculs bíceps o quàdriceps, de pacients amb DMD obtingudes en fresc en el moment del diagnòstic o pacients controls obtingudes en pacients intervinguts per altres causes i sense patologia muscular.

Les mostres musculars humanes provenen de la col·lecció privada del laboratori de Neurologia Pediàtrica del VHIR, amb referència C.0003146 en el Registre Nacional de Biobancs de l'Institut de Salut Carlos III.

ID Biòpsia	Sexe	Edat intervenció	Diagnòstic	Mutació
1	H		Sa	-
2	H	6 anys	DMD	c.9844C>T, p.Arg2982X
3	H	3 anys	DMD	c.6554dupT, p. Leu2185Phefs*38
4	H	2 anys	DMD	c.9148 C>T, p.Gln3050X

Taula 1.1. Resum de les biòpsies humanes utilitzades en aquest treball obtingudes de la col·lecció C.0003146.

3.1.4.1. Neteja de la biòpsia i etapa de pre-incubació ("clot")

L'extracció de la biòpsia muscular es va realitzar per l'equip mèdic a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. Una vegada obtinguda van ser immediatament introduïdes en un tub estèril amb 50 ml de medi HBSS complet (Biowest) suplementat amb PSF (Biowest). La mostra de teixit es va transportar a temperatura ambient fins al laboratori on es va processar.

Sota una campana de flux horitzontal, es va col·locar en una placa de Petri estèril amb medi HBSS complet (Biowest) amb PSF i es va introduir la peça de múscul. Amb l'ajuda de pinces i bisturí es va descartar el teixit adipós i conjuntiu, així com les restes de sang. Finalment, es van trossejar la peça muscular d'aproximadament 3 mm (explants).

Aquests explants es van col·locar en una nova placa de cultiu amb medi condicionat compost per medi M-199 (Biowest) suplementat amb 35% FBS (Biowest) i PSF. Es van incubar a 37 °C i 5% de CO₂ ON. Aquest temps serveix perquè es recuperin les cèl·lules musculars i preparar-les pel posterior creixement iniciant l'etapa de preincubació anomenada "clot". En cas de no iniciar el cultiu muscular en aquest moment, es van congelar les peces de la manera descrita a l'apartat 1.5.

L'etapa de "clot" té com a finalitat afavorir el creixement diferencial dels fibroblasts i de les cèl·lules musculars, promovent d'aquesta manera l'eliminació de la gran quantitat de fibroblasts procedents de la biòpsia i enriquint els posteriors cultius de mioblasts. Es van canviar els explants a una nova placa de cultiu i es va preparar una barreja de 5 ml de medi condicionat i 1,25 ml de

plasma humà (provinent de companys voluntaris de sexe masculí, no fumadors i que no ingereixen cafeïna ni cap mena de medicament durant les 24-48 hores prèvies a l'extracció de sang). Aquesta barreja es va filtrar sobre els explants col·locats a la placa de cultiu, mitjançant un filtre estèril de 0,22 µm (Thermo Scientific). La placa es va incubar a 37 °C i 5% CO₂, i es va comprovar que passades unes hores el medi líquid estava solidificat en un estat gelatinós. D'aquesta manera les peces de múscul quedaven en suspensió en un medi semisòlid i es deixaven incubar durant uns 7-10 dies o fins que començaven a créixer cèl·lules dels explants.

3.1.4.2. Creixement de cèl·lules miogèniques a partir d'explants.

Després de 7-10 dies, els explants s'extreien mitjançant pinces del medi gelatinós i s'eliminaven les restes de gelatina o cèl·lules mitjançant un rentant amb PBS. Es van traspasar els explants nets a una nova placa de cultiu amb medi HBSS amb PSF, i es va procedir a trossejar les peces a 1 mm (microexplants). Aquest pas no només proporciona una major superfície de creixement, sinó que afavoreix la regeneració del teixit danyat i, per tant, el creixement de cèl·lules satèl·lit o miogèniques. Es va preparar una barreja de 0,5 ml d'1,5% gelatina (Sigma) i 0,25 ml de plasma humà que es va filtrar mitjançant filtres de 0,22 µm. Es va col·locar la barreja sobre una placa de cultius de 60 mm de diàmetre i, immediatament, es va repartir uniformement per tota la superfície amb un raspador (*cell-scraper*). A continuació, i el més ràpidament possible, es van col·locar els microexplants sobre la pel·lícula gelatinosa, ben separats entre ells. Es va afegir a la placa 10-12 gotes de medi aneural complet compost per DMEM:M199 (Biowest) en proporció 3:1, suplementat amb 10% FBS (Biowest), insulina (Sigma) 10 µg/ml, glutamina (Sigma) 2 mM, factor de creixement fibroblàstic (FGF, Becton & Dickinson) 25 ng/ml, factor de creixement epidèrmic (EGF, Becton & Dickinson) 10 ng/ml i 1% PSB. Es van col·locar les plaques a l'incubador de CO₂ a 37 °C durant 15 minuts, per afavorir la gelificació de la matriu de gelatina i l'adhesió dels microexplants. Transcorregut el temps es van afegir 4 ml de medi aneural complet i es va retornar la placa a l'incubador i vam esperar al creixement miooblàstic.

Es va monitoritzar el creixement miooblàstic en els explants. Normalment passats 7-8 dies des de l'inici del creixement en microexplants, ja es van poder retirar de la placa i iniciar el segon explant. D'aquesta manera es poden realitzar fins a 4 explants depenent de l'edat del pacient donant de la biòpsia. De les plaques on es van retirar els explants, es van tripsinitzar les cèl·lules miooblàstiques com s'explica en el següent apartat i a partir d'aquest moment es va poder procedir a l'amplificació del cultiu.

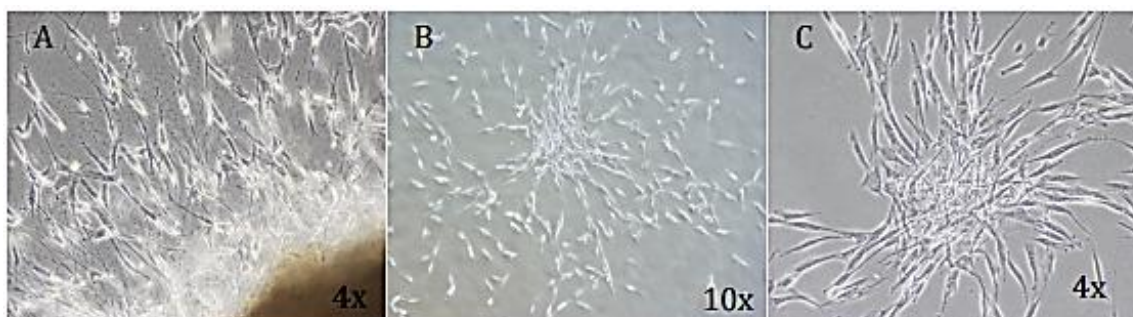


Figura 1.3. (A) Creixement de mioblastes al voltant dels explants. (B) i (C) Mioblastes provinents d'explants tripsinitzats.

3.1.4.3. Selecció mioblastes amb tècnica de pre-plating

Un cop aïllades les cèl·lules extretes dels explants, aquesta població cel·lular està formada per mioblasts, però també per altres tipus cel·lulars que també estan presents en el teixit muscular com són els fibroblasts i pericits. Hi ha diferents tècniques d'aïllament de mioblastes, nosaltres en concret ens basarem en la tècnica de *pre-plating*, que es basa en les diferències en les característiques d'adhesió de les cèl·lules fibroblàstiques i les mioblàstiques [39].

Un cop tripsinitzades les cèl·lules, es van centrifugar a 250 g durant 5 min i el pellet es va resuspendre en medi de creixement. Es van col·locar les plaques a l'incubador amb 5% CO₂ a 37 °C durant 20 minuts. A continuació, el sobrenedant de la placa es va passar a una nova placa i es va col·locar a l'incubador amb 5% CO₂ a 37 °C.

3.1.4.4. Tècnica de diferenciació clàssica

La tècnica més utilitzada per a l'obtenció de miotubs diferenciats a partir de mioblastes es basa en la reducció o privació de sèrum i per tant de factor de creixement i proteïnes. Ens basem en la modificació de les tècniques descrites per Sweeney i Welch [33], [40].

Els mioblastes extrets de biòpsies es van sembrar a una densitat cel·lular adequada per arribar al 80%-90% de confluència i es van cultivar amb medi de diferenciació en plaques prèviament recobertes amb una dilució 1:10 de Matrigel (Corning) seguint les instruccions del fabricant.

S'han avaluat diferents medis de diferenciació, la composició dels quals està descrita a la a la taula 1.1. Es cultiven durant 8 dies i es realitza canvi de medi de diferenciació cada dos dies.

ID	Medi	Horse Serum (HS)	Insulina (µg/ml)	Apotransferrina (mg/ml)	Bibliografia
1	DMEM high	-	10	10	(Welch <i>et al.</i> , 2007)
2	DMEM low : M199 (1:3)	2% HS	10	-	(Stern-Straeter <i>et al.</i> , 2008; Nesmith <i>et al.</i> , 2016; Witt <i>et al.</i> , 2017)
3	DMEM high	2% HS	100	-	(Asakura, Komaki and Rudnicki, 2001; Gaster <i>et al.</i> , 2001; Barro <i>et al.</i> , 2010; Li <i>et al.</i> , 2013)

Taula 1.2. Resum de la composició de diferents medis de diferenciació testats en mioblasts humans. HS: *horse serum*, FBS: *fetal bovine serum*.

3.1.4.5. Tècnica de diferenciació d'alta densitat de sembra

La tècnica de diferenciació d'alta densitat de sembra (HDSS; en anglès *high density seeding spot*) es basa en la descrita per Marquette *et al.* (Marquette and Sognier, 2016). Es caracteritza per la utilització d'una gran quantitat de cèl·lules i consisteix en la producció d'un model de teixit mitjançant la sembra de les cèl·lules a una concentració elevada en un punt específic de la placa.

Ha sigut utilitzada amb la línia cel·lular immortalitzada C2C12, en la que s'ha pogut demostrar un alt grau de diferenciació cel·lular.

Per tal de poder-la utilitzar per cultius primaris humans cal tenir en consideració les limitacions d'aquest tipus cel·lular: número limitat de cèl·lules que es poden aconseguir per biòpsia, senescència després d'un número limitat de passes, biòpsies de malalties rares pel que són mostres molt valuoses i escasses. Quan parlem de mioblasts primaris humans de malalties neuromusculars també hem de tenir en compte una possible velocitat de creixement més lenta o dificultats de diferenciació inherents a la pròpia patologia.

Per tant, es procedeix a realitzar aquesta tècnica en plaques de mida molt més reduïda amb un número cel·lular reduït a petita escala i s'afegeix una matriu extracel·lular que ajuda a la diferenciació cel·lular.

Les cèl·lules musculars primàries es van sembrar en 4 punts equidistants en una placa de 24 pous sense recobrir, a una densitat de 2×10^4 cel/ml en 20 μ l. La sembra es va realitzar en una gota tan petita com sigui possible, amb cura de què no es mogui la gota, s'incuba a 37 °C amb 5% CO₂ durant 20 minuts. Atès que la quantitat de medi en la gota juntament amb les cèl·lules és un volum molt petit es va mantenir cura que aquest medi no s'evaporés completament, per que podrien morir les cèl·lules sembrades. En cas que el medi s'evapori durant aquest temps es va afegir més medi sobre la gota evitant el desplaçament d'aquesta.

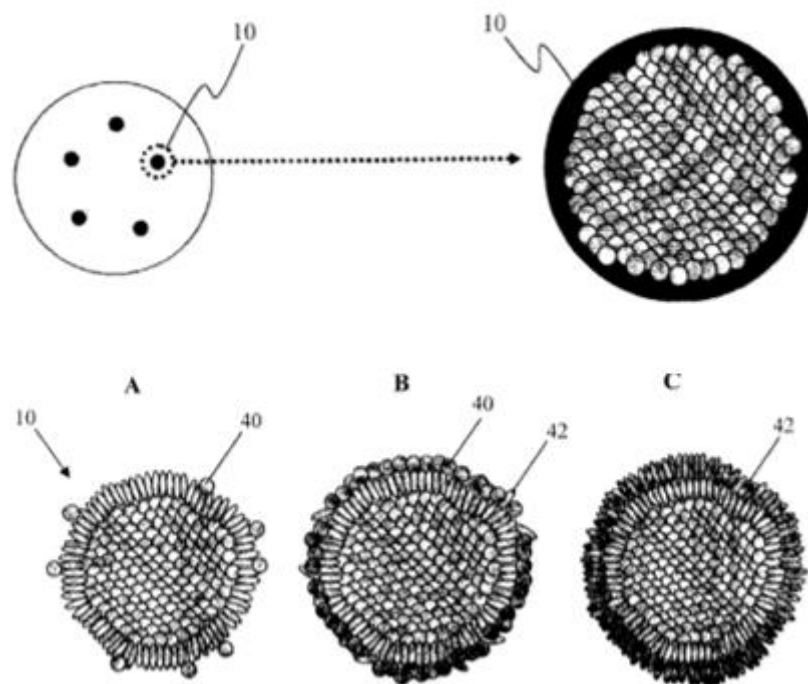


Figura 1.4. Esquema de la tècnica HDSS on es mostren la posició de les sèmres a alta densitat i el creixement a partir d'aquests (Rando and Blau, 1994).

Un cop transcorregut el temps, les cèl·lules van estar enganxades en la seva majoria a la placa de cultiu. Seguidament, es va procedir a afegir 100 μ l de Matrigel (Corning) en una dilució 1:10 amb DMEM *high glucose* (Biowest) + 1% PSF (Biowest), i es va tornar a incubar les plaques a 37 °C a 5% CO₂ durant 20 minuts. Un cop gelificat el Matrigel es va afegir 200 μ l de medi de creixement. Per les cèl·lules de múscul primari va ser DMEM:M199 (Biowest) en proporció 3:1,

suplementat amb 10% FBS (Biowest), insulina (Sigma) 10 µg/ml, glutamina (Sigma) 2 mM, factor de creixement fibroblàstic (FGF, Becton & Dickinson) 25 ng/ml, factor de creixement epidèrmic (EGF, Becton & Dickinson) 10 ng/ml i 1% PSB (Biowest). Per la línia cel·lular C2C12 el medi de creixement va consistir en DMEM high glucose (Biowest) i 10% FBS (Biowest) amb 1% PSF (Biowest). Es van deixar incubant durant 14-16 dies i es va canviar el medi de creixement cada 2-3 dies.

3.1.5. Cultius primari de múscul esquelètic murí

Tots els procediments es van dur a terme segons les normes institucionals, que segueixen els requisits establerts pel Gobierno de España i la Comunitat Europea (BOE 67, 18/3/88, RD 233/1988 i BOE 256, 2/10/90) i prèviament aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) del Campus Vall d'Hebrón.

Per l'obtenció de cultiu primari es va utilitzar el model murí de distrofinopatia, mdx (C57BL10/ScSn-mdx) i el seu respectiu control (C57BL10/ScSn) que van ser adquirits a Jackson Laboratories.

3.1.5.1. Obtenció de cèl·lules precursors mioblàstiques (MPCs) murines mitjançant digestió enzimàtica

La tècnica utilitzada per l'obtenció de cèl·lules musculars primàries a partir de biòpsies de ratolí, ha sigut la tècnica de digestió enzimàtica descrita per Springer *et al.* (Springer, Rando and Blau, 1997).

Els animals se'n van eutanasiar mitjançant dislocació cervical i es van col·locar en decúbit supí en una cabina de bioseguretat II per treballar en condicions estèrils. Es va retirar la pell de les extremitats posteriors i amb l'ajuda d'un bisturí es van aïllar el gastrocnemius i el sòleus. Un cop extrets els grups musculars es van col·locar dintre una placa de 6 pous que conté PBS i antibiòtic.

Amb l'ajuda d'una lupa i bisturí es van netejar els músculs retirant pèls, pell, teixit adipós, tendons i ossos. Seguidament, es va procedir amb l'ajuda de dos bisturís a tallar els músculs en peces petites d'una mida aproximada d'un mm. Es va afegir 5 ml de medi de creixement (HAM'S F10 (Biowest) amb 20% FBS inactivat (Biowest) i 25 µg/ml de factor de creixement fibroblàstic de ratolí (FGF, Becton & Dickinson) i es van transferir les peces musculars junt amb el medi de creixement a un tub de 15 ml. Es van afegir a la mateixa placa dos cops més 5 ml i es van transferir al mateix tub de 15 ml, per ajudar a transferir totes les peces musculars. Es va centrifugar a 600 g durant 4 minuts a temperatura ambient. Es va descartar el sobrenedant i el va resuspendre el pellet en 16 ml de medi de creixement i es va transferir a una placa p100. Es va afegir 1 ml de pronasa a l'1,5% i es va incubar 1 hora a 37 °C. El contingut de la placa p100 es va resuspendre amb una pipeta de 10 ml FBS (Biowest) recoberta amb FBS. Seguidament, es va centrifugar 900 g durant 5 minuts a temperatura ambient. Es va descartar el sobrenedant i el pellet es va resuspendre en 7 ml de medi RV (HAM'S F10 + 1% PSF) i es va procedir a la separació mecànica de les MPCs passant a través d'una pipeta de 10 ml recoberta amb FBS 20 vegades. Seguidament, es va deixar que el teixit es diposés al fons del tub, es va traspasar el sobrenedant a un tub nou, es va afegir 6 ml de medi RV i es va repetir la separació mecànica dos cops més. Finalment, es va disposar de 19 ml de suspensió que es va filtrar amb un filtre de 100 µm (Biologix, Research Company). Un cop filtrat, es van afegir 5 ml que es van fer passar pel filtre i es va centrifugar a 1400 g durant 10 minuts a temperatura ambient. Amb el sobrenedant

obtingut es va procedir a realitzar el primer pas de pre-plating per tal d'obtenir un cultiu ric en MCPs i eliminar els fibroblasts.

3.1.5.2. Tècnica *Pre-plating* modificada

La tècnica de pre-plating modificada utilitzada per l'aïllament de mioblastes es basa en les descrites per Hindi i Lavasani *et al.* (Hindi *et al.*, no date; Lavasani *et al.*, 2013).

El sobrenedant de l'últim pas digestió enzimàtica de múscul esquelètic de ratolí es va col·locar en una placa p100 recoberta amb 1% gelatina (Thermo Fisher) i es va incubar a 37°C, 5% CO₂ durant 2 hores. Les cèl·lules adherides a la placa es van marcar com a PP1 (pre-plate 1) i les cèl·lules suspeses en el sobrenedant es van traspasar a una nova placa p100 recoberta amb gelatina al 1%, i es van anomenar la fracció PP2. A la fracció PP1 se li va afegir 5 ml de medi de creixement (HAM'S F10 amb 20% FBS i 25 µg/ml FGF murí). Es van incubar la fracció PP1 i PP2 durant 24 hores a 37 C i 5% CO₂.

Després de la incubació de PP2, es va recollir el sobrenedant i es va centrifugar a 930g, 4°C durant 5 min. Es va descartar el sobrenedant i el pellet cel·lular restant es va resuspendre en 5 ml de medi de creixement i es va transferir a una nova p100 recoberta amb gelatina al 1%, aquesta fracció es va anomenar PP3. Es va afegir 5 ml de medi de creixement a la fracció PP2 i es va retornar a l'incubador. El pas prèviament explicat es va repetir fins a arribar a obtenir una fracció PP6. L'última fracció anomenada PP6 es va mantenir en una p100 recoberta amb gelatina a l'1% a 37 °C i 5% CO₂ durant 72 hores. La majoria de les cèl·lules amb lenta adherència es van trobar a la fracció PP5 i PP6. Aquestes dues fraccions un cop crescudes es van adjuntar a una darrera fracció que es va anomenar PP7. En aquesta etapa, les cèl·lules que es van obtenir a PP7 van tenir un aspecte rodó, petites i refringents, i és la fracció on es van trobar més número i proporció d'MPCs.

3.1.5.3. Diferenciació de mioblastes de ratolí

La diferenciació de les MPCs en mioblastes a miotubs es va induir mitjançant la privació de sèrum. Les cèl·lules es van sembrar a una alta densitat (25.000 cèl·lules / cm² aprox) i se les va deixar créixer fins arribar a confluència del 90% aproximadament. Un cop es va arribar a l'estat de confluència desitjat es va canviar el medi de cultiu de creixement per un medi de diferenciació amb un baix percentatge de sèrum (DMEM high glucose amb 2% de sèrum de cavall (HS)). El medi es va canviar cada 24-48 hores. A partir del tercer dia ja es van poder apreciar la formació de miotubs i contracció espontània.

3.2. Tractaments

3.2.1. Compostos amb activitat *read-through*

Es van sembrar triplicats per cada cultiu cel·lular procedent de diferent origen. Les cèl·lules es van deixar créixer fins assolir confluència suficient per a començar el tractament de diferenciació i es van tractar amb les següents condicions experimentals: (1) medi complet, (2) medi de diferenciació, (3) medi de diferenciació més el vehicle dels fàrmacs (DMSO) (Sigma) , (4) 10 µM PTC124, (5) 10 µM RTC13 i (6) 10 µM RTC14. En el cas dels cultius primaris de mioblastes humans només es va testar el PTC124. Els medis amb les diferents condicions es van canviar cada 24

hores i es va seguir el protocol descrit per Welch et al i Finkel et al (Welch *et al.*, 2007; Finkel *et al.*, 2013).

3.3. Anàlisi de viabilitat cel·lular

La línia cel·lular C1C12 va ser utilitzada per testar la viabilitat dels diferents compostos amb activitat *read-through*. El medi de creixement que es va utilitzar es DMEM amb 1% PSF i 10% FBS (Biowest).

Per a determinar la viabilitat, les cèl·lules es van sembrar a la densitat òptima adequada en una placa de 96 pous, es van incubar durant 24 hores a 37 °C i 5% CO₂. A continuació, es va resuspendre en DMEM amb 1% PSF (Biowest) les diferents concentracions dels compostos a testar i es van posar en contacte amb les cèl·lules.

A les 24 hores post tractament es va realitzar l'assaig de lactat deshidrogenasa (LDH). La mesura de l'activitat de LDH es un assaig colorimètric de citotoxicitat de ampli espectre. L'enzim LDH es troba en el citoplasma de les cèl·lules, que s'allibera quan aquestes moren. El increment de l'activitat LDH en el sobrenedant del cultiu es proporcional al número de cèl·lules mortes.

Es va utilitzar el sobrenedant de una nova placa de 96 pous i es va afegir el mateix volum de *reagent solution* (Life Technologies, Daiphorase/NAD⁺ catalyst tetrazolium salt INT and sodium lactate). La placa es va incubar a temperatura ambient durant 30 minuts i seguidament es va analitzar la densitat òptica, mitjançant un lector de plaques a 490 nm usant com a referència la longitud d'ona de 620 nm. Els resultats es van expressar com a % de viabilitat respecte a cèl·lules control no tractades.

3.4. Anàlisi proteic

3.4.1. Extracció de proteïnes

L'extracció de proteïnes es va realitzar mitjançant l'homogeneïtzació de les mostres amb un tampó de lisi RIPA (preparat a partir de Trizma Base, clorur sòdic, SDS, NP-40 i àcid deoxicòlic) amb inhibidors de proteases (Thermo Scientific) i inhibidors de fosfatases (Roche). Les cèl·lules cultivades es van homogeneïtzar passant-les per una agulla de 30g i es van col·locar en un agitador a 4°C O/N. A continuació, es van centrifugar els tubs a 13.000 rpm durant 10 minuts a 4°C. El sobrenedant resultant és el que conté les proteïnes extretes i es van emmagatzemar a -20 °C fins a la seva anàlisi.

3.4.2. Quantificació de proteïnes

Es va dur a terme seguint les instruccions del fabricant de *DC Protein Assay kit* de Biorad. Es llegeix l'absorbància a 750 nm mitjançant el lector de plaques (Elx800 Absorbance Microplate Reader, Biotek). Es va generar una recta patró amb BSA (BioRad) en la que es van extrapolar els valors de concentració de les mostres.

3.4.3. Anàlisi per electroforesi de proteïnes

3.4.3.1. Preparació de les mostres

Les mostres es van diluir a una concentració de 20 µg en tampó de lisi RIPA i es va afegir tampó de càrrega (Laemmli buffer TRIS 250 mM (pH 6.8), 6,5 ml TRIS 1M (pH 6.8), SDS 10%, Bromophenol blue 0.5%, Glicerol 50% i β-mercaptoetanol). A continuació, es van desnaturalitzar les mostres a 95°C durant 5 minuts.

3.4.3.2. Tècnica de Western blot

Es van preparar gels d'acrilamida de 8%. El gel està compost per dues parts: *Resolving* i *Stacking*, que són preparats amb bis-acrilamida, aigua, tampó Tris 1.5M (pH=8.8) pel *Resolving* o tampó Tris 0,5M (pH=6.8) per l'*Stacking*, 10%SDS, 10% persulfat d'amoni (APS) i tetrametilètilè diamina (TEMED).

Es van carregar les mostres al gel i es va fer córrer en tampó d'electroforesi (24mM Tris base, 190mM glicina i 3,4mM SDS) a 120V constants durant 1,5h, en una cubeta i font d'alimentació PowerPac300 (BioRad). A continuació, el gel es va transferir a una membrana de PVDF (ThermoScientific), en una cubeta de transferència (BioRad) amb tampó de transferència (24 mM Tris base, 200mM glicina i 20% metanol) a 4°C i 150 mA constant O/N. Seguidament, es va bloquejar la membrana amb llet descremada (Difco) al 5%, diluïda en PBS i 0.1% Tween (PBS-T), durant 1 hora en agitació constant a temperatura ambient. Es van realitzar tres rentats de 5 minuts de les membranes en PBS-T i es va incubar les membranes amb l'anticòs primari anti-Dys I (NCL-DYS1- Novocastra, 1:100) , diluït en PBS-T, O/N a 4°C en agitació. A continuació es van rentar la membranes tres vegades més durant 5 minuts amb PBST-T i es va incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb HRP anti-Mouse (Dako, 1:5000) diluït en llet al 5% en PBS-T durant 1 hora a temperatura ambient.

Finalment, es va revelar la membrana incubant durant 5 minuts amb Immobilon® Forte Westerhn HRP substrate (Millipore) seguint les instruccions del fabricant. Es va visualitzar el revelat amb l'aparell Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences). Es va quantificar el nivell de proteïna d'interès i el control de càrrega amb el software d'ImageJ 1.6 (Schneider *et al.*, 2017).

3.4.4. Anàlisi per immunofluorescència

Les cèl·lules es van rentar amb PBS 1x fred i es van fixar amb 2% PFA, preparat en PBS 1x fred durant 20 minuts a 4°C. A continuació, es van rentar tres vegades amb PBS 1x: Tritó 0,1%. Es va posar solució de bloqueig (5% goat serum (GS): 5% Bovine serum albumin (BSA) en PBS1x : Tritó 0,1%) durant 1 hora a temperatura ambient. Un cop fixades i bloquejades, les cèl·lules es van incubar amb l'anticòs primari αMHC (NB300-284 Novus Biologicals; dilució 1:250), desmina (ab32362 Abcam, dilució 1:200) preparat en solució de bloqueig O/N a 4°C. Es van rentar tres cops amb PBS1x: Tritó 0,1 % i es va posar l'anticòs secundari anti-mouse 596 (Thermofisher; dilució 1:200) o anti-rabbit 488 (Thermofisher; dilució 1:500) preparat en solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient. Per finalitzar, es va rentar amb PBS1x:Tritó 0,1% i es va realitzar el muntatge amb Vectashield amb DAPI (VectorLab). Les mostres es van analitzar amb el microscopi de fluorescència (Olympus).

3.4.5. Índex de fusió

És una eina que ens ajuda a interpretar el tant percentatge de cèl·lules musculars diferenciades en cultiu. El índex de fusió es va determinar com el percentatge de nuclis en miofibrils (≥ 2 nuclis) respecte el número de nuclis totals, en miofibrils marcats amb MHC.

3.5. Anàlisi estadístic

Totes les dades dels grups s'expressen com a mitjana \pm desviació estàndard. Les comparacions entre grups es van realitzar mitjançant el programari Prism 8 (GraphPad) mitjançant t-test. Les diferències entre grups es van considerar significatives quan $p < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$).

4. Resultats

4.1. Plataforma in vitro muscular humana

4.1.1. Purificació de cultiu primari humà

Un cop realitzat l'aïllament de cèl·lules primàries humanes musculars amb el protocol establert anteriorment al grup de Neurologia Pediàtrica, s'obté un cultiu heterogeni format per cèl·lules mioblàstiques i també per altres cèl·lules presents en el teixit muscular com són els fibroblasts i els pericits. Va ser necessari establir un protocol de separació òptim per a obtenir un cultiu cel·lular amb un percentatge de mioblastes elevat. Les diferents estratègies de purificació que es van testar van ser basades en la tècnica de pre-plating, que es basa en les característiques d'adhesió diferencials dels diversos tipus cel·lulars presents en el cultiu (Rando and Blau, 1994).

Per testar les diferents condicions es va utilitzar el cultiu cel·lular obtingut de control sa.

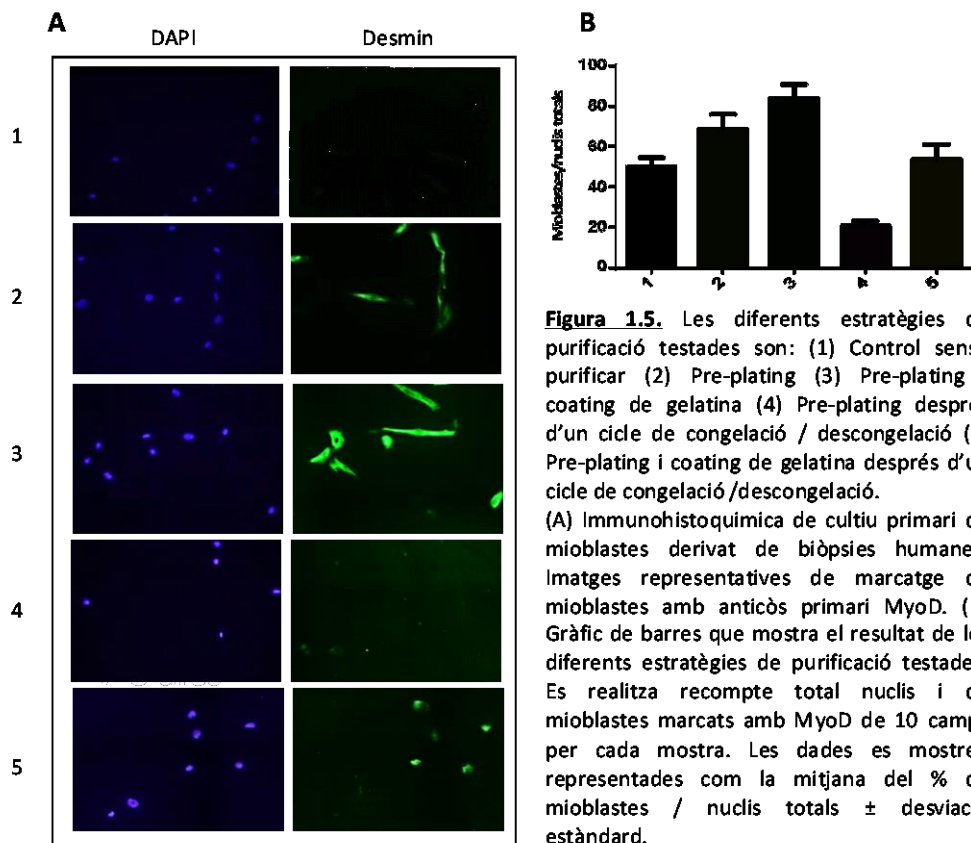


Figura 1.5. Les diferents estratègies de purificació testades son: (1) Control sense purificar (2) Pre-plating (3) Pre-plating i coating de gelatina (4) Pre-plating després d'un cicle de congelació / descongelació (5) Pre-plating i coating de gelatina després d'un cicle de congelació / descongelació. (A) Immunohistoquímica de cultiu primari de mioblastes derivat de biòpsies humanes. Imatges representatives de marcatge de mioblastes amb anticòs primari MyoD. (B) Gràfic de barres que mostra el resultat de les diferents estratègies de purificació testades. Es realitza recompte total nuclis i de mioblastes marcats amb MyoD de 10 camps per cada mostra. Les dades es mostren representades com la mitjana del % de mioblastes / nuclis totals \pm desviació estàndard.

La immunotinció per a la desmina, un marcador establert de cèl·lules miogèniques, va permetre la identificació de les cèl·lules miogèniques dins de la barreja heterogènia de cèl·lules mononucleades extretes de l'explant procedent de la biòpsia muscular. Els nuclis de totes les cèl·lules es van marcar mitjançant la sonda d'unió a l'ADN 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). A la Figura 1.5. observem que la condició on obtenim un major proporció de cèl·lules mioblàstiques respecte el nombre total de cèl·lules en cultiu és quan es realitza el pre-plating un cop tripsinitzats de l'explant en placa coatada amb gelatina i sense cicles de congelació / descongelació.

4.1.2. Tècnica de diferenciació clàssica per privació de sèrum

A diferència de les condicions de proliferació i creixement de les cèl·lules musculars humanes que estan ben establertes, les condicions de diferenciació per els sistemes musculars *in vitro* publicats fins el moment han demostrat tenir capacitat de diferenciació limitades. Cosa que fa necessària la caracterització d'aquestes condicions per assolir una capacitat de diferenciació major.

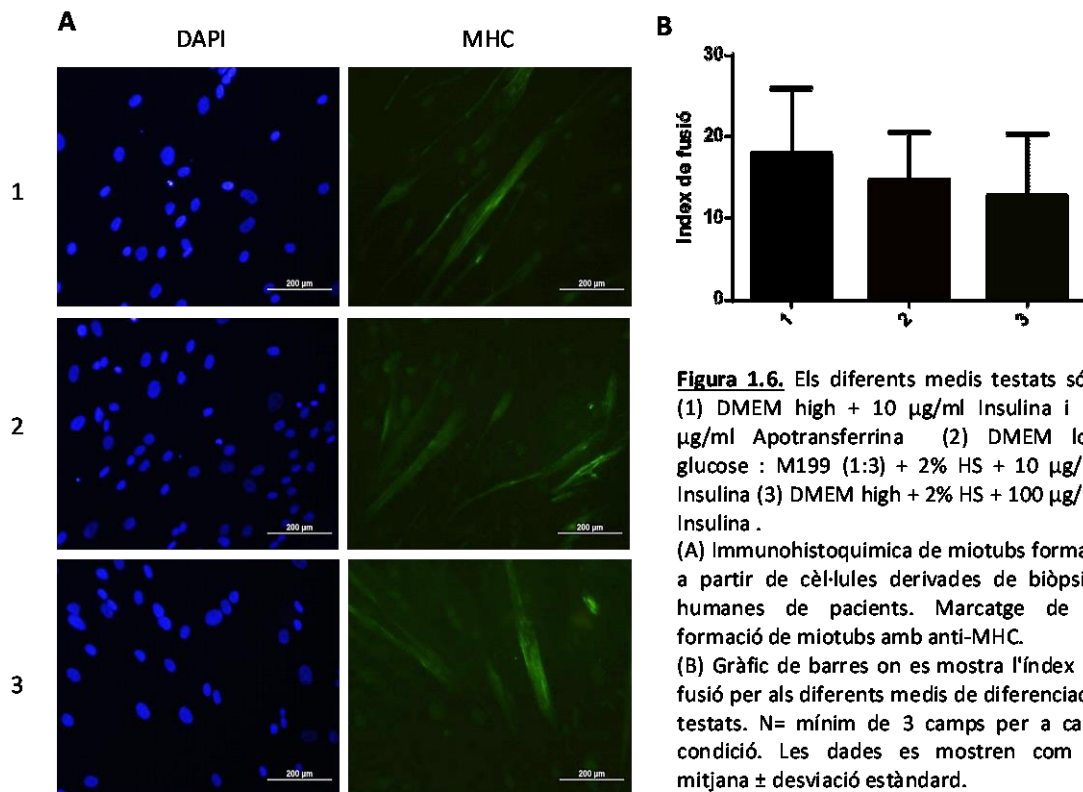
A diferència de les condicions de proliferació i creixement de les cèl·lules musculars humanes que estan ben establertes, les condicions de diferenciació per els sistemes musculars *in vitro* publicats fins el moment han demostrat tenir capacitat de diferenciació limitades. Fet que fa necessària la caracterització d'aquestes condicions per assolir una capacitat de diferenciació optima.

La tècnica més utilitzada es basa en la reducció o privació de sèrum. Per tal d'escollir els medis de diferenciació a analitzar es va fer una cerca bibliogràfica de treballs relacionats amb la diferenciació de cultius de cèl·lules musculars i principalment de cultius primaris d'humans. Una vegada feta aquesta cerca es van escollir els medis a testar en funció de l'experiència prèvia en el grup d'investigació, de la freqüència de la seva utilització i dels resultats obtinguts en els treballs cercats (Veure taula 1.2).

ID	Medi	Horse Serum (HS)	Insulina (µg/ml)	Apotransferrina (mg/ml)	Bibliografia
1	DMEM high	-	10	10	(Welch <i>et al.</i> , 2007)
2	DMEM low : M199 (1:3)	2% HS	10	-	(Stern-Straeter <i>et al.</i> , 2008; Nesmith <i>et al.</i> , 2016; Witt <i>et al.</i> , 2017)
3	DMEM high	2% HS	100	-	(Asakura, Komaki and Rudnicki, 2001; Gaster <i>et al.</i> , 2001; Barro <i>et al.</i> , 2010; Li <i>et al.</i> , 2013)

Taula 1.2. Resum de la composició de diferents medis de diferenciació testats en mioblasts humans.

Els diferents medis de diferenciació es van testar en cultius de mioblastes primaris d'individus sans. Es va avaluar la diferenciació mitjançant immunohistoquímica amb marcatge de MHC i es va calcular l'índex de fusió. A la figura 1.6. podem observar com l'índex de fusió per tots els medis testats es troba entre 15-20%, sent el medi compost per DMEM amb alta concentració de glucosa, insulina a 10 µg/ml i apotransferrina 10 mg/ml amb el que s'assoleix un índex de fusió més elevat.



4.1.3. Tècnica de diferenciació d'alta densitat de sembra

La tècnica de diferenciació d'alta densitat de sembra o HDSS esta basada en la tècnica descrita per Marquette *et al.* (Marquette and Sognier, 2016) per la línia cel·lular C2C12. En relació a les cèl·lules musculars primàries, el maneig i el cultiu de cèl·lules C2C12 és realment senzill però per tal de poder utilitzar aquesta tècnica en cultius primaris humans s'han de tenir en compte les seves limitacions i adequar la tècnica a aquest tipus cel·lular i amb unes dimensions molt més reduïdes. Això és degut a que els mioblastes primaris humans no immortalitzats són una eina molt valuosa, però a l'hora limitada per una lenta proliferació cel·lular que redueix enormement la finestra temporal per fer els experiments. D'aquesta manera, era importantíssim podem disminuir la gran quantitat de cèl·lules utilitzada en aquesta tècnica. A més, les línies immortalitzades de ratolí com ara la C2C12 i els mioblastes murins primaris, a diferència dels mioblastes primaris humans, tenen una bona diferenciació amb medis de cultiu específics amb percentatges de sèrum variables entre el 8%-1%, i no necessiten de recobriments de gelatina o matrigel per la seva correcta diferenciació (Cheng *et al.*, 2014).

Per a comprovar que els canvis proposats i detallats anteriorment a mètodes són òptims per assolir a un grau de diferenciació igual o superior a l'indicat en la tècnica anteriorment descrita, es va realitzar una prova pilot on es van testar els canvis en la mateixa línia cel·lular utilitzada per Marquette *et al.*, la C2C12.

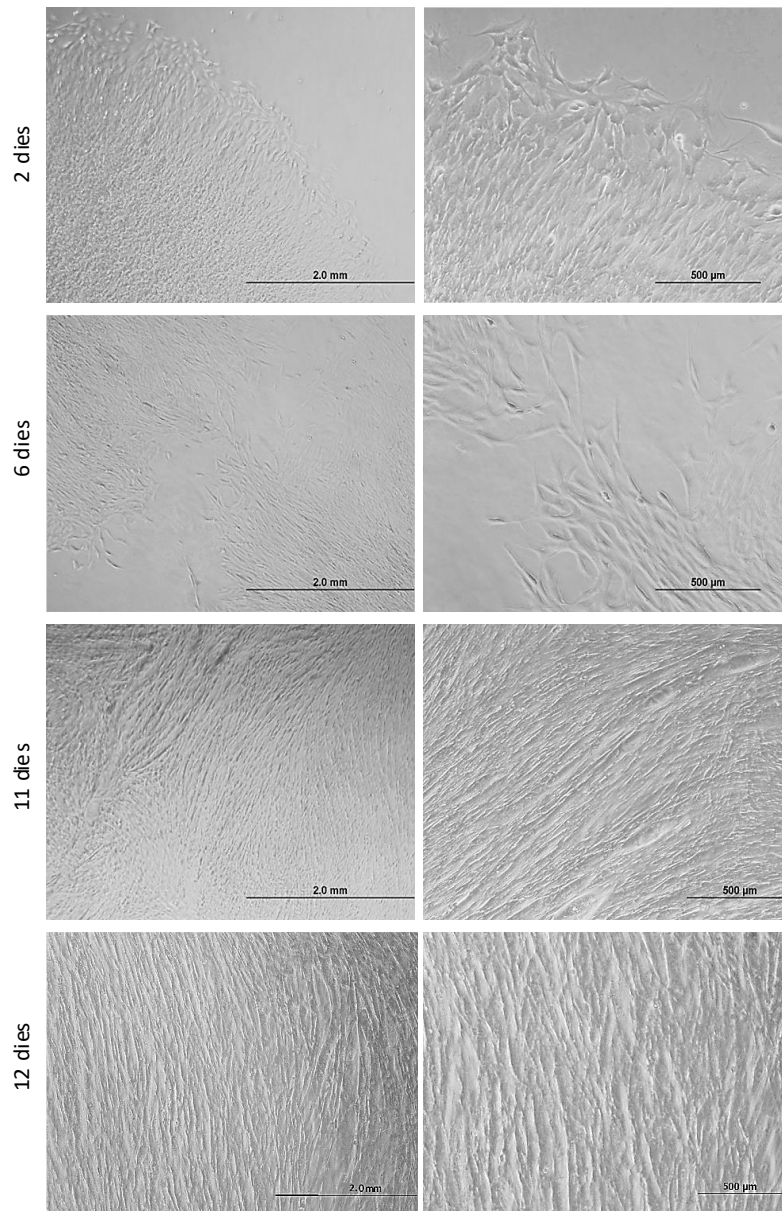


Figura 1.7. Imatges de microscòpia de contrast de fase del procés de diferenciació C2C12 amb la tècnica HDSS.

Al sembrar les cèl·lules amb la tècnica HDSS es va aconseguir una densitat elevada de cèl·lules concentrades en un punt. A la figura 1.7 podem observar com a les 48 hores de la sembra les cèl·lules van començar a proliferar a la perifèria del punt de la sembra. Les cèl·lules de la perifèria tenien un aspecte més pla respecte les de l'interior, que s'observaven més arrodonides. Això és degut a que les cèl·lules de l'interior que tenien més contacte cèl·lula - cèl·lula van començar a fusionar-se per madurar i formar cèl·lules multinucleades, mentre que les de la perifèria seguien proliferant i cobrint la part de la placa que es trobava buida i sense cèl·lules. També podem observar com a l'interior del punt de sembra les cèl·lules tenien una estructura alineada i organitzada, a diferència de la perifèria en que les cèl·lules estaven desorganitzades i en diverses orientacions.

Als 6 dies de la sembra vam veure com les cèl·lules van continuar creixent en una direcció cap a l'exterior del punt de sembra cap a zones desocupades de la placa de cultiu. La producció

continuada de cèl·lules va augmentar gradualment la grandària del punt de sembra. A mesura que els punts de sembra s'aproximaven veiem com les cèl·lules de la perifèria que es trobaven desorganitzades s'acabaven alineant com la resta de la placa en una estructura organitzada.

Als 11 i 12 dies de la sembra les cèl·lules van seguir creixent, però en aquest punt quedava molt poc espai disponible per continuar creixent de manera que les cèl·lules quedaven limitades espacialment per les cèl·lules adjacents i per tant es van veure obligades a alinear-se cap a l'exterior del punt de sembra. A mesura que les cèl·lules van anar creixent, va disminuir l'espai disponible i les cèl·lules van experimentar un augment de contacte cèl·lula - cèl·lula fet que va augmentar la diferenciació cel·lular.

A partir del dia 11 ja era evident un alt grau de diferenciació, i es produïen contraccions espontànies.

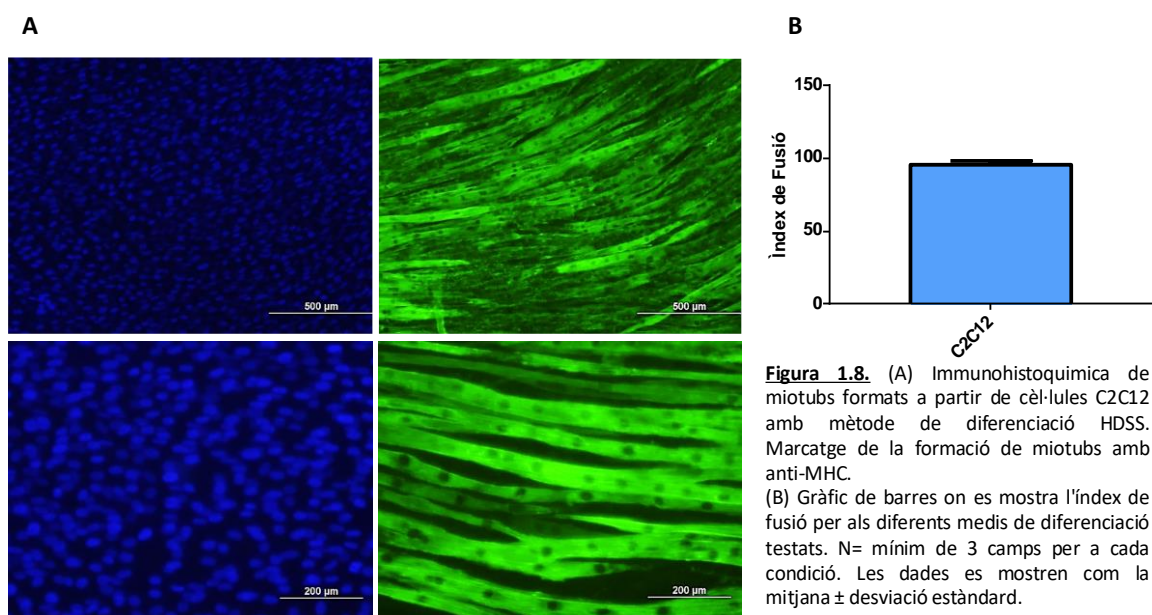


Figura 1.8. (A) Immunohistoquímica de miotubs formats a partir de cèl·lules C2C12 amb mètode de diferenciació HDSS. Marcatge de la formació de miotubs amb anti-MHC. (B) Gràfic de barres on es mostra l'índex de fusió per als diferents medis de diferenciació testats. N= mínim de 3 camps per a cada condició. Les dades es mostren com la mitjana ± desviació estàndard.

Catorze dies després de la sembra en HDSS es va procedir a realitzar la caracterització del grau de diferenciació immunohistquímica amb marcatge anti-MHC i es va quantificar l'índex de fusió. A la figura 1.8 podem observar un alt nivell d'alineació i organització cel·lular, associat a un alt grau de diferenciació cel·lular, amb un índex de fusió de $95,5 \pm 2,05$.

A continuació es va realitzar la tècnica HDSS amb les modificacions testades en cèl·lules primàries humanes sanes i de pacients amb DMD.

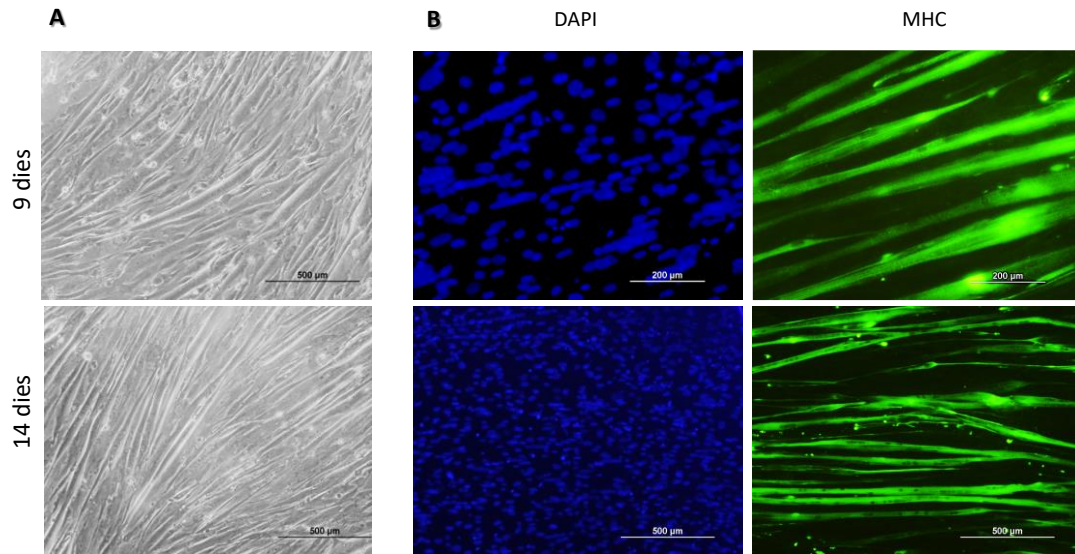


Figura 1.9. (A) Imatges de microscòpia de contrast de fase del procés de diferenciació mioblastes extrets de biòpsies humana sana amb la tècnica HDSS. (B) Immunohistoquímica de miotubs formats amb la tècnica HDSS a partir de cèl·lules derivades de biòpsies humanes de pacients amb DMD. Marcatge de la formació de miotubs amb anti-MHC.

En les cèl·lules primàries humanes provinent de controls sense cap patologia neuromuscular podem observar un alt grau d'organització i diferenciació cel·lular.

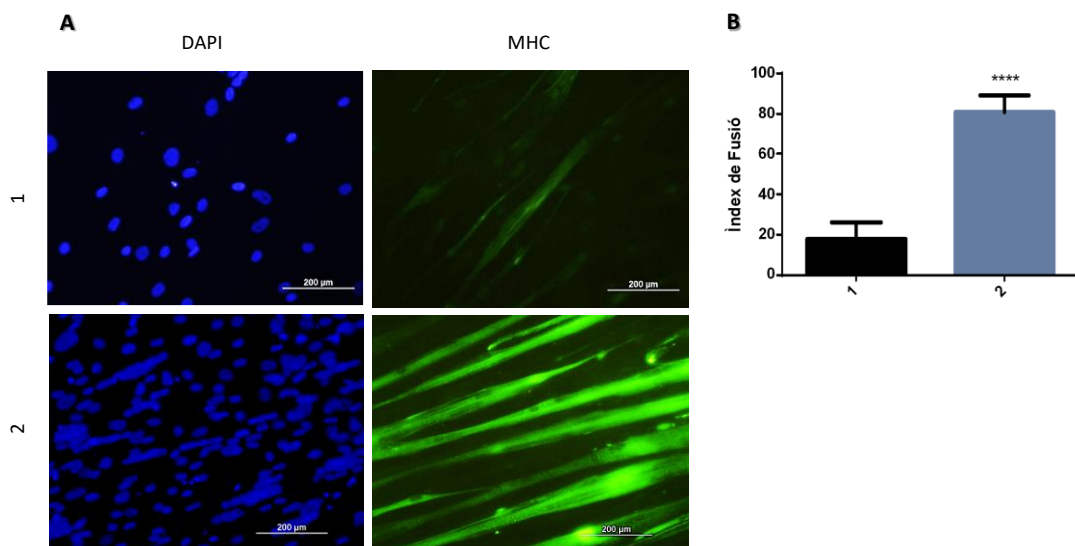


Figura 1.10. Els diferents mètodes de diferenciació testats són (1) Diferenciació clàssica per privació de sèrum (2) Tècnica de diferenciació HDSS (A) Immunohistoquímica de miotubs diferenciats a partir de cèl·lules derivades de biòpsies humanes. Marcatge de la formació de miotubs amb anti-MHC. (B) Gràfic de barres on es mostra l'índex de fusió pels diferents mètodes de diferenciació testats. N= mínim de 3 camps per a cada condició. Les dades es mostren com la mitjana ± desviació estàndard. (****) $p < 0,0001$.

A la figura 1.10 podem veure una comparativa del grau de diferenciació obtinguda en cèl·lules primàries humanes sanes amb la tècnica de diferenciació per privació de sèrum i amb la tècnica

HDSS. Els miofibrils diferenciats amb la tècnica HDSS es troben alineats i amb una alta organització mentre que els miofibrils formats amb privació de sèrum estan més desorganitzats i no tenen una orientació clara. Mitjançant la tècnica de privació de sèrum el índex de fusió més elevat obtingut va ser $17,59 \pm 5,05$ i amb la tècnica HDSS $83,1 \pm 8,6$ amb una diferència significativa amb un valor de p de 0,0001.

També es va realitzar la diferenciació amb la tècnica de HDSS en tres cultius de pacients amb DMD. A la figura 1.11 podem observar com l'índex de fusió és molt variable entre els diferents cultius. En dos dels tres cultius testats es pot observar una alta alineació i organització, amb un índex de fusió de $72,39(\pm 6,5)\%$ i $77,62(\pm 4,2)\%$, similar a l'obtingut en el cultiu primari humà control (sense patologia neuromuscular). En el tercer cultiu testat es va obtenir un índex de fusió 68 vegades més baix amb un valor de $6,04 (\pm 5,62)\%$.

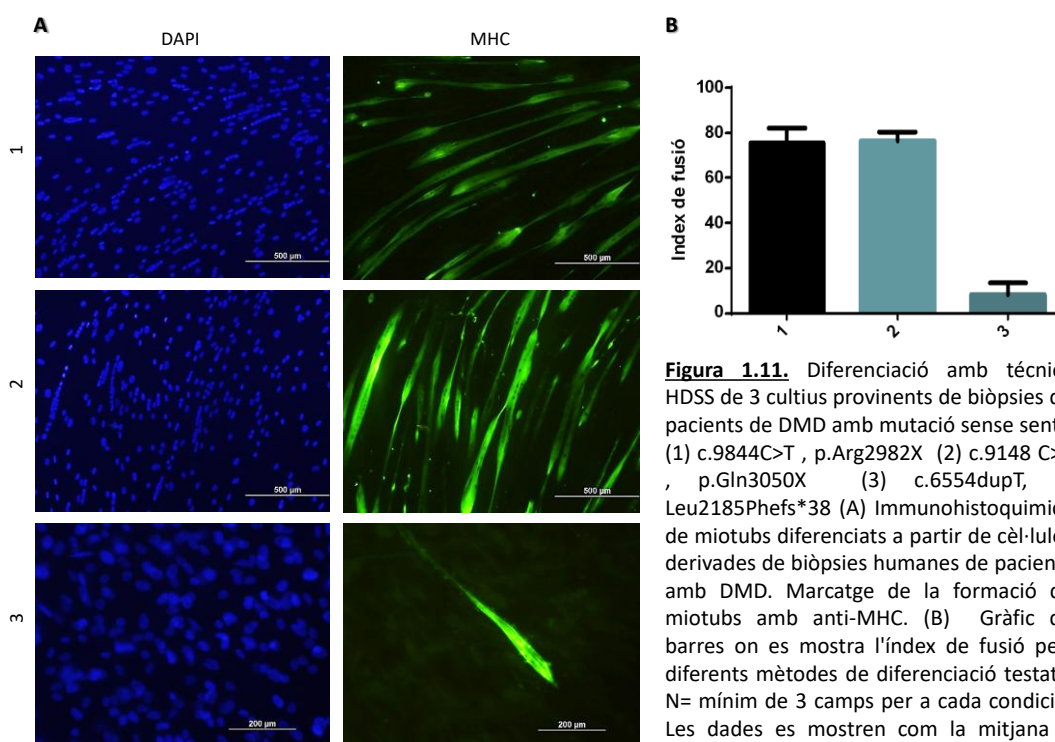


Figura 1.11. Diferenciació amb tècnica HDSS de 3 cultius provinents de biòpsies de pacients de DMD amb mutació sense sentit (1) c.9844C>T, p.Arg2982X (2) c.9148 C>T, p.Gln3050X (3) c.6554dupT, p. Leu2185Phefs*38 (A) Immunohistoquímica de miofibrils diferenciats a partir de cèl·lules derivades de biòpsies humanes de pacients amb DMD. Marcatge de la formació de miofibrils amb anti-MHC. (B) Gràfic de barres on es mostra l'índex de fusió pels diferents mètodes de diferenciació testats. N= mínim de 3 camps per a cada condició. Les dades es mostren com la mitjana \pm desviació estàndard.

En els cultius de miofibrils a partir de cèl·lules primàries de múscul de pacients amb DMD podem observar que hi ha zones on els nuclis no es troben alineats sino que s'acumulen formant el que s'anomena bossa nuclear.

4.2. Cultiu primari de ratolí

4.2.1. Obtenció de MPCs murines mitjançant digestió enzimàtica i tècnica de preplating modificada.

Les cèl·lules obtingudes a partir de la digestió química es van col·locar en una placa recoberta de gelatina i després de 2 h d'incubació el sobrenedant es va passar a un altre placa i es va incubar durant 24 h, aquest últim pas es va repetir 5 vegades. Un cop extretes les cèl·lules del múscul de ratolí podem observar morfològicament dos tipus cel·lulars: els fibroblasts que tenen

forma estrellada i plana, i els mioblastes que tenen forma arrodonida i molta més refringència. A la figura 1.12 podem observar com en els primers *pre-platings* trobem les dues poblacions de cèl·lules, i majoritàriament es veuen cèl·lules fibroblàstiques, però a mesura que anem fent *pre-platings* la població mioblàstica va creixent i la fibroblàstica es va reduint. A l'última imatge referent a *pre-plating 7* podem observar com la població majoritàriament es mioblàstica i s'han reduït les cèl·lules fibroblàstiques al mínim.

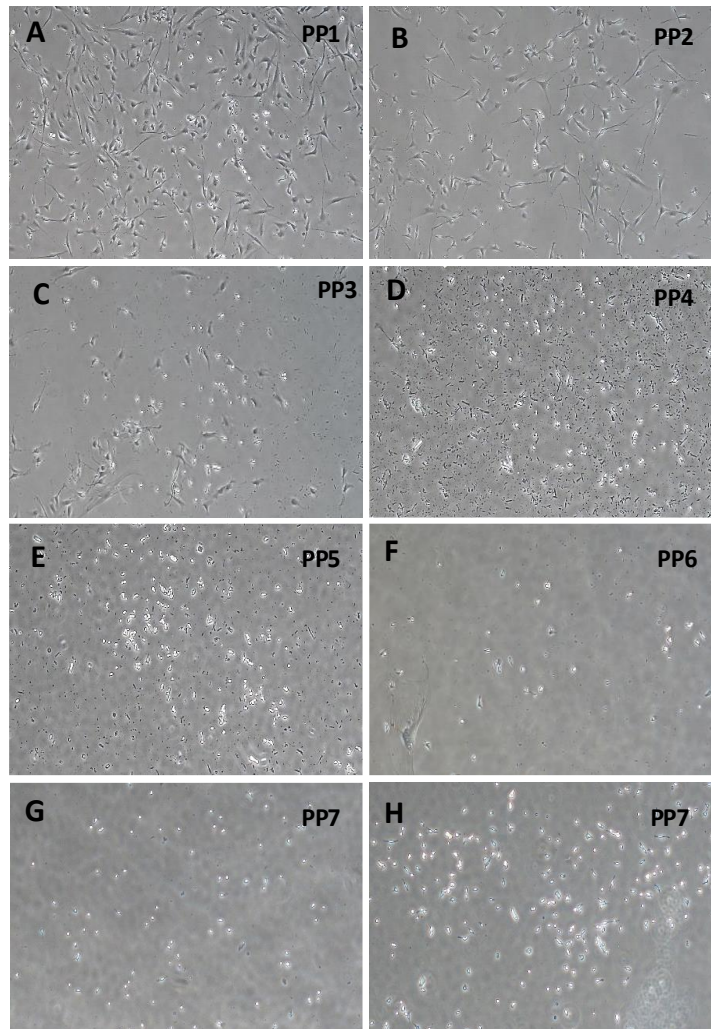


Figura 1.12. Cèl·lules observades després de la digestió química i seguint la tècnica de pre-plating modificada (A) Cèl·lules obtingudes després de 2 hores d'incubació, (B) Cèl·lules obtingudes després de 24 hores d'incubació posteriors (PP2), (C) Cèl·lules obtingudes després de 48 hores d'incubació (PP3), (D) Cèl·lules obtingudes al 72 hores d'incubació (PP4), (E) Cèl·lules obtingudes a les 96 hores d'incubació, (F) Cèl·lules obtingudes a les 120 hores d'incubació, (G) i (H) Cèl·lules obtingudes a partir de pre-plating de PP5 i PP6. Imatges obtingudes amb microscopi Nikon Eclipse TS100,x4.

Les MPCs purificades es van expandir i el resultat va ser l'obtenció d'una població de MPCs sense fibroblastes amb una bona taxa de creixement i ràpida expansió (Figura 1.13).

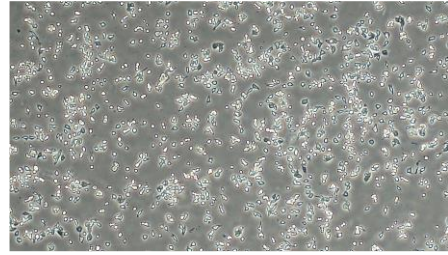


Figura 1.13. MPCs obtingudes a partir de l'expansió de cultius purificats a través de pre-plating modificat. Imatges obtingudes amb microscopi Nikon Eclipse TS100,x4.

Les imatges de la figura 1.12 i 1.13 corresponen a les cèl·lules obtingudes per a ratolins mdx, es va realitzar el mateix procediment per ratolins wt obtenint els mateix resultats però no hi ha fotografies disponibles.

Per verificar el percentatge de mioblastes als cultius després de la tècnica de pre-plating modificada es va realitzar una immunohistoquímica amb un anticòs primari anti-desmina en els cultius primaris de ratolins mdx i wt. A la figura 1.14 podem observar com més del 90% de les cèl·lules son desmina positives.

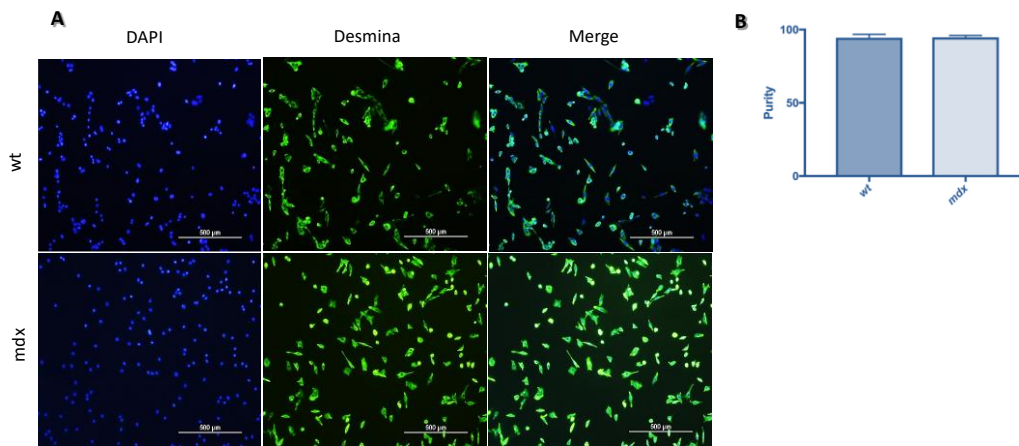


Figura 1.14. Immunohistoquímica de cultiu primari de mioblastes derivat de múscul de ratolí. Imatges representatives de marcatge de mioblastes amb anticòs primari Desmina (B) Gràfic de barres que mostra el total de cèl·lules positives per Desmina. Es realitza recompte total nuclis i de mioblastes marcats amb Desmina de 10 camps per cada mostra. Les dades es mostren representades com la mitjana del % de mioblastes / nuclis totals \pm desviació estàndard. . Imatges obtingudes amb Microscopi confocal *FluoView™* 1000 Olympus.

4.2.2. Diferenciació de MPCs

A partir de MPCs aïllades podem observar la formació de miotubs per privació de sèrum en el medi, tant en cultius de ratolins wt com en mdx. A la figura 1.15 podem observar la formació d'estructures allargades i fusiformes, característiques típiques dels miotubs.

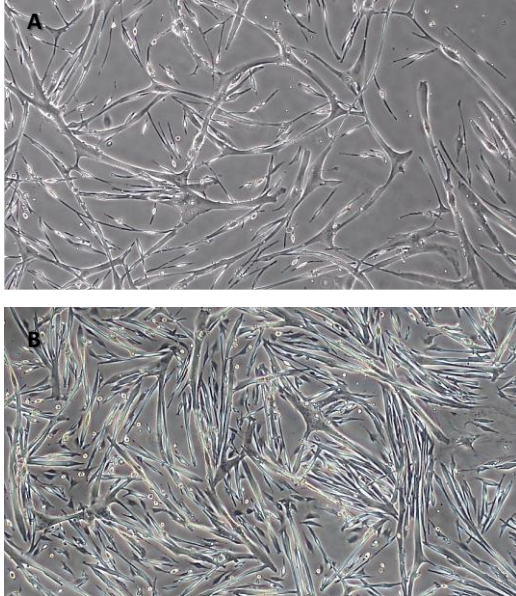


Figura 1.15. Mioblasts diferenciats derivats de ratolins wt (A) i mdx (B). Imatges obtingudes amb microscopi Nikon Eclipse TS100,x4.

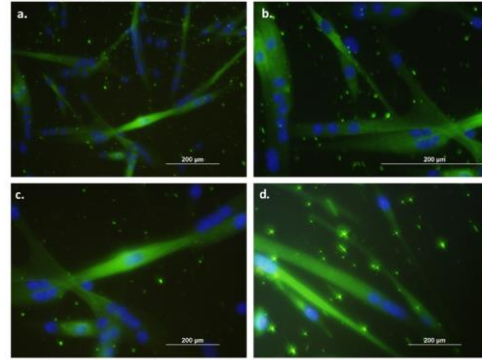


Figura 1.16. Marcatge de la formació de miotubs amb anti-MHC de cultius wt (a i b) i mdx (c i d).

Per poder verificar que aquestes estructures observades són miotubs diferenciats es realitza una immunohistoquímica anti-MHC. A la figura 1.16 podem veure com hi ha estructures multi-nucleades marcades amb verd positives amb la tinció anti-MHC. De manera que es pot confirmar que en ambdòs cultius arriben a la diferenciació de miotubs amb la privació de sèrum.

4.3. Tractament amb fàrmacs read-through

4.3.1. Citotoxicitat i viabilitat cel·lular

Els resultats obtinguts per a l'assaig de citotoxicitat LDH van mostrar que, tal com es va informar anteriorment en la literatura, tant RTC13 com RTC14 tenen un percentatge més elevat de citotoxicitat en comparació a PTC124 (Figura 1.17). A més, el percentatge de viabilitat cel·lular va ser més gran en els cultius tractats amb PTC124, sent superior al 97%.

Assaig LDH

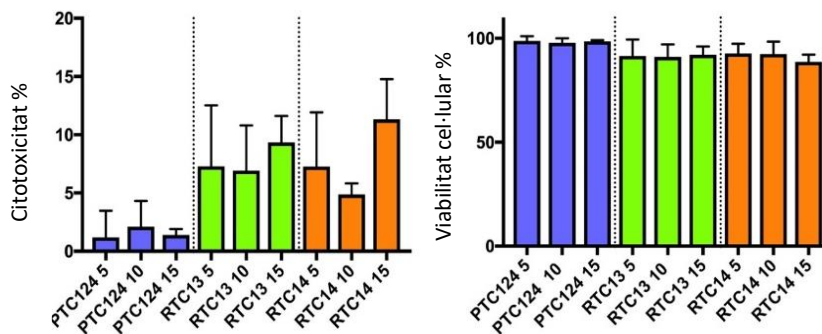


Figura 1.17. Percentatge de citotoxicitat i viabilitat cel·lular quan es tracten cèl·lules C2C12 amb PTC124, RTC13 i RTC14.

4.3.2. Tractament amb PTC124 en cèl·lules primàries humanes diferenciades

El tractament a cèl·lules primàries humanes amb PTC124 es va realitzar en els cultius de pacients amb DMD i controls mostrats a la taula 1.2 (veure a apartat 3.1.3.4. Tècnica de diferenciació clàssica). Es van sembrar a la densitat esmentada i un cop arribada a la confluència de 80-90% es va iniciar el protocol de diferenciació amb la tècnica HDSS. Després de canviar el medi a medi de diferenciació es va iniciar el tractament amb 10 μ M PTC124.

A les 24 h de l'inici del tractament es va observar un increment de la mort cel·lular en els cultius tractats amb PTC124, a diferència dels controls amb el vehicle de fàrmac (DMSO) en els que a simple vista no es va visualitzar mort cel·lular. Entre les 48 i 72 h després d'iniciar el tractament, totes les cèl·lules dels pous tractats amb PTC124 estaven mortes i desenganxades de la superfície de la placa, a diferència dels controls no tractats (imatges no disponibles).

Es va decidir no tractar amb altres fàrmacs *read-through* a l'espera de resultats amb els test *in vitro* amb cèl·lules de ratolí atesa la importància de les mostres humanes i de la dificultat en la seva obtenció.

4.3.3. Tractament amb PTC124, RCT 13 i RTC 14 en cèl·lules primàries de ratolí

El tractament en cèl·lules primàries de ratolí amb PTC124, RTC13 i RTC14 es va realitzar en cultius primaris extrets de ratolins mdx. Es van sembrar a la densitat adequada i un cop arribada a la confluència de 80-90% es va iniciar el protocol de diferenciació per privació de sèrum i es va iniciar el tractament amb 10 μ M de PTC124, RTC13 i RTC14. Es va canviar el medi cada 24 h afegint nova dosi de fàrmac cada canvi de medi. A la figura 1.18 podem observar com no hi han diferències significatives per anàlisi microscòpic entre les cèl·lules no tractades i les tractades. Es veu com hi ha un augment de diferenciació a mesura que passa el temps amb el medi de diferenciació, arribant a la seva màxima diferenciació entre les 72 i les 96 hores. No observem mort cel·lular significativa, tot i que cal remarcar que les cèl·lules tractades amb RTC13 agafaven una tonalitat groguenca deguda al fàrmac, però aparentment aquest fet no repercutia en la viabilitat cel·lular.

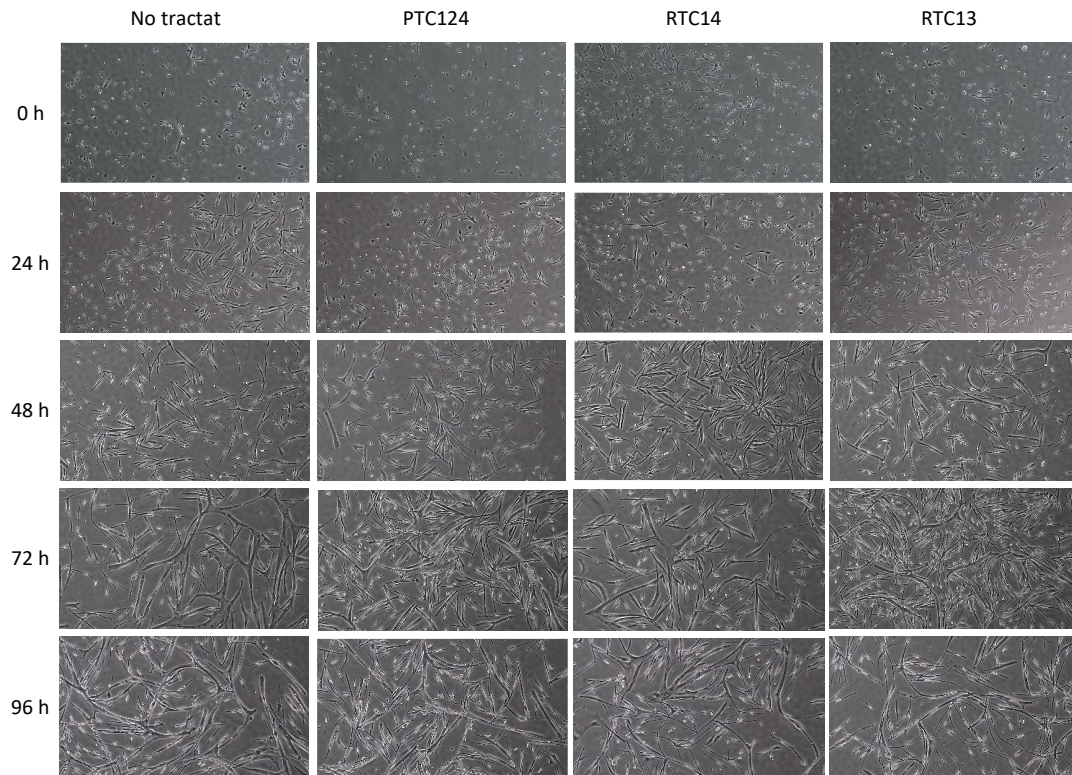


Figura 1.18. Tractament de cèl·lules primàries derivades de ratolins mdx amb diferents fàrmacs read-through. Imatges obtingudes amb microscopi Nikon Eclipse TS100,x4.

Per avaluar l'efecte dels tractament *in vitro* en les cèl·lules de ratolí mdx es va realitzar un anàlisi de Western blot on es va detectar l'expressió de distrofina. No es va observar proteïna en les cèl·lules tractades amb cap dels fàrmacs *read-through* analitzats.

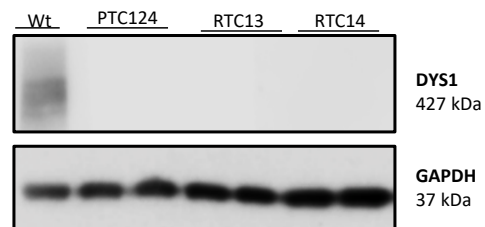


Figura 1.19. Western Blot per Dysl i GAPDH de cèl·lules primàries de ratolí mdx tractades amb diferents fàrmacs read-through. GAPDH es la proteïna utilitzada com a control de càrrega que ens permet normalitzar l'expressió de les proteïnes d'interès.

CAPÍTOL 2

1. Introducció

1.1. Distròfia Muscular Congènita tipus 1A (MDC1A)

La Distròfia Muscular Congènita tipus 1A (MDC1A) és una de les Distròfies Musculars Congènites (DMC) més severes. Està causada per la deficiència total o parcial de laminina- α 2. La prevalença no és ben coneguda, però s'estima entre 1-9/1.000.000 de persones. MDC1A és una malaltia ultra rara i representa al voltant del 30% dels casos de distròfia muscular congènita als països europeus, però és més rara als països asiàtics (Durbeej, 2015).

Es tracta d'una malaltia autosòmica recessiva causada per mutacions en el gen *LAMA2* (6q22.33), que conté 65 exons i codifica per la subunitat α 2 de la laminina o merosina. S'han identificat més de 350 mutacions en el gen, que provoquen la malaltia associada a una absència de laminina 211 (L211) parcial o completa (Pasteuning-Vuhman *et al.*, 2018). Segons la quantitat de proteïna residual funcional, el fenotip varia en la seva gravetat (Jones *et al.*, 2001; Durbeej, 2015).

Es caracteritza per tenir inici en la infància, i es presenta amb hipotonia més o menys severa i debilitat muscular progressiva amb pèrdua dels ítems del desenvolupament motor. Poden tenir altres símptomes com contractures, escoliosi, rigidesa de la columna vertebral, problemes respiratoris i deglutoris (Pasteuning-Vuhman *et al.*, 2018).

Actualment és una malaltia incurable i de mal pronòstic, sovint provoca una mort prematura i disminueix la qualitat de vida dels pacients requerint dispositius d'assistència per la mobilitat, respiració i deglució. El tractament actual és generalment simptomàtic i inclou un seguiment multidisciplinari per part de facultatius especialistes (Gawlik and Durbeej, 2011; Yurchenco *et al.*, 2018).

El diagnòstic es basa en troballes clíniques, EMG, biòpsia muscular i cutània, imatge cerebral i muscular, anàlisi de sang per detectar nivells de creatina cinasa (CK) i proves genètiques moleculars [12]. Es pot fer diagnòstic prenatal, però només es realitza en dones embarassades amb antecedents familiars coneguts (Naom *et al.*, 1997).

1.2. Biologia de les Laminines

Les laminines són les principals proteïnes de la matriu extracel·lular, encarregades de l'estabilitat i integrat muscular. Es troben principalment a la membrana basal que es compon de làmines fines de matriu extracel·lular subjacents a les cèl·lules epitelials i endotelials, i que envolten les cèl·lules musculars, de Schwann i grasses (Goudenege *et al.*, 2010).

Les laminines són proteïnes heterotrimèriques (400-900 kDa) fortament glicosilades, constituïdes per tres subunitats (α , β i γ). Hi ha cinc gens diferents que codifiquen per subunitats α (LAMA1-5), quatre per subunitats β (LAMB1-4) i tres per γ (LAMC1-3). Diferents combinacions de subunitats s'acoblen intracel·lularment i se secreten a la matriu extracel·lular o a la circulació (Hamill *et al.*, 2009; Goudenege *et al.*, 2010).

Els diferents trimers de laminines s'anomenen depenent de la composició de les cadenes que els formen (Hamill *et al.*, 2009; Holmberg and Durbeej, 2013).]. La primera isoforma de laminina

descoberta va ser la laminina 111 (L111), i es va trobar en el sarcoma murí *Engelberth-Holm-Swarm* (EHS). Està formada per les subunitats: $\alpha 1$, $\beta 1$ i $\gamma 1$. S'expressa durant el desenvolupament embrionari i no es troba present en condicions normals en el múscul esquelètic adult.

La següent laminina descoberta va ser la L211, un trímer compost per les subunitats $\alpha 2$, $\beta 1$ i $\gamma 1$, que va ser inicialment aïllada de la placenta. Constitueix la forma principal present a la membrana basal de la matriu extracel·lular del múscul esquelètic adult i els nervis perifèrics. És una molècula d'adhesió crucial en la senyalització cel·lular i la supervivència i diferenciació de la miofibra, actuant com a element central en la xarxa de proteïnes extracel·lulars (Goudenege *et al.*, 2010).

La laminina- $\alpha 2$ forma part del trímer L211 i té un pes molecular predit de 380 kDa. Pot ser escindida per una convertasa semblant a la furina en un segment N-terminal de 300 kDa i un segment C-terminal de 80 kDa, que romanen associats de manera no covalent. Es desconeix si aquest procés proteolític té conseqüències funcionals en el múscul *in vivo*. Té una organització similar a les altres laminines amb diverses regions *rod-like* (Gawlik and Durbeej, 2011).

Els dominis LG de la cadena laminina- $\alpha 2$ de l'extrem C terminal s'uneixen a la proteïna α -dístroglicà (α -DG), un component extracel·lular del complex distrofina-glicoproteïna (Sunada *et al.*, 1994), i amb la integrina $\alpha 7\beta 1$, expressada a la superfície de la fibra muscular. Aquestes unions són les encarregades de portar a terme la comunicació entre la làmina basal de l'ECM i el citoesquelet de la cèl·lula muscular, i proporcionen suport mecànic i estabilització del sarcolemma durant la contracció muscular (Timpl and Brown, 1996).

El domini LN de la laminina- $\alpha 2$ és l'encarregat d'interaccionar amb l'agrina, proteïna que té un paper molt important en la formació de la unió neuromuscular. A més, és fonamental per l'assemblatge en xarxes amb altres cadenes de laminina- $\alpha 2$ i components de la làmina basal del múscul, inclòs el col·lagen IV, fibulina-1, perlecà i nidogen, entre d'altres (Timpl and Brown, 1996; Hamill *et al.*, 2009).

La L211 actua com a element central en la xarxa de proteïnes extracel·lulars mitjançant les interaccions amb les proteïnes anteriorment esmentades, protegint la fibra muscular de danys sota l'estrès mecànic constant que es produeix durant la contracció muscular. També participa en la supervivència i diferenciació de les cèl·lules musculars mitjançant interaccions amb la integrina $\alpha 7\beta 1$ i l' α -DG, que activen PI3K/Akt i MAPK (Sunada *et al.*, 1994).

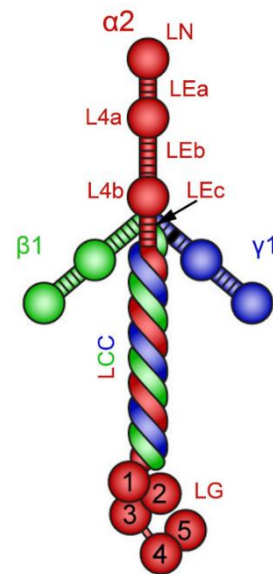


Figura 2.1. Esquema de l'estructura de laminina-211 (Gawlik and Durbeej, 2011).

1.3. Patogènesi molecular de la MDC1A

L'absència total o parcial de la cadena laminina- $\alpha 2$ causa una alteració de l'enllaç mecànic entre la fibra muscular i la membrana basal. La manca d'unió i l'alteració de la senyalització intracel·lular provoca danys freqüents en el sarcolemma que provoca lesió muscular, que alhora induïx una resposta inflamatòria. A més, pel fet que la deficiència de la merosina també afecta

negativament a la senyalització de les cèl·lules satèl·lits, el pacient es troba en un estat de dany muscular constant infiltrat per cèl·lules inflamatòries, provocant una marcada inflamació crònica. Aquests cicles repetitius de degeneració, reacció inflamatòria i regeneració, donen lloc a l'activació de les cèl·lules estromals mesenquimals residents en el teixit, que promouen la substitució de teixit muscular per teixit fibròtic i/o adipós, provocant la degeneració del múscul esquelètic i la pèrdua de funcionalitat. Per aquesta raó, la MDC1A es caracteritza per pèrdua de massa muscular, i a escala cel·lular, reducció de grandària i número de cèl·lules musculars diferenciades (Meinen *et al.*, no date; Goudenege *et al.*, 2010).

Per compensar les deficiències provocades per l'absència o disminució de la laminina- $\alpha 2$, hi ha una sobre-expressió compensatòria de gens com LAMA4 i LAMA5, augmentant la producció d'aquestes proteïnes. Però aquest augment no és suficient per compensar la pèrdua de L211. Això és degut al fet que els seus enllaços amb la α -DG són insuficients i no poden induir l'autopolimerització com fa la laminina- $\alpha 2$ (Meinen *et al.*, no date; Yurchenco *et al.*, 2018).

També hi ha regulació compensatòria d'altres cadenes de laminines com la $\beta 2$ que es troba molt reduïda a la membrana basal del sarcolemma alhora que l' α -DG es troba reduït en el múscul esquelètic. En canvi, l'expressió de l' α -DG en la forma glicosilada està lleugerament augmentada, juntament amb el β -DG. L'expressió de la integrina $\alpha 7 \beta 1$ també es veu desregulada, i tot i que sembla augmentar la seva síntesi, hi ha un deteriorament evident de la seva acumulació al sarcolemma (Durbeej, 2015).

1.4. Models in vivo de MDC1A

Hi ha diversos models animals de MDC1A com són el peix zebra, ratolí, gos i gat. Actualment, el model més utilitzat per a realitzar els estudis bàsics i preclínic per MDC1A és el ratolí.

S'han desenvolupat diversos models de ratolí per MDC1A que tenen moltes de les característiques de la malaltia i confirmen la correlació entre l'expressió de la cadena $\alpha 2$ i la severitat de la malaltia (Pasteuning-Vuhman *et al.*, 2018) A la figura 2.2 podem observar un resum dels models que es disposen avui en dia juntament amb les seves característiques.

Ratolí	Mutació	Expressió proteïna Laminina- $\alpha 2$	Supervivència (setmanes)	Pes corporal	Distròfia Muscular
dy^{71}/dy^{71}	Missense ENU-induïda	Normal	No reducció	Normal	Suau
dy^{21}/dy^{21}	Splice-site Espontània	Reduïda	Lleugerament reduïda	Lleugerament baix	Suau
dy/dy	Desconeguda Espontània	Molt baixa o absent	20-35	Baix	Moderada
dy^w/dy^w	knockout	Molt baixa o absent	5 16	Molt baix	Severa

dy^{3K}/dy^{3K}	knockout	Absent	3 5	Molt baix	Severa
-------------------	----------	--------	-----	-----------	--------

Taula 2.1. Resum de les principals característiques dels models actuals per ratolí per MDC1A (Yurchenco *et al.*, 2018).

El model de ratolí Dy2j/Dy2j (C57BL/6J-Lama2dy-2j) és el que s'ha utilitzat en la realització d'aquest treball. Aquests ratolins tenen una mutació espontània homozigota d'*splicing* que causa una deleció *in frame* de 57 aminoàcids (exó 39-40) de la laminina- $\alpha 2$, produint una proteïna L211 truncada (Pasteuning-Vuhman *et al.*, 2018; Yurchenco *et al.*, 2018). Es caracteritzen per una debilitat progressiva amb component miopàtic i paràlisi per neuropatia perifèrica que comença al voltant de les tres setmanes d'edat. El múscul esquelètic mostra canvis degeneratius amb proliferació de nuclis en els sarcolemmes, augmenta la quantitat de teixit intersticial i la variació de mida entres les fibres musculars individuals (Sunada *et al.*, 1995; Durbeej, 2015; Pasteuning-Vuhman *et al.*, 2018) .

1.5. Teràpies per MDC1A

Hi ha diverses estratègies de tractament proposades actualment que estan en diferent fase de desenvolupament. La més òbvia seria la restauració de la laminina- $\alpha 2$, tot i que la laminina $\alpha 1$ (la isoforma embrionària predominant, altament homòloga a la $\alpha 2$) també s'ha demostrat que pot substituir amb èxit la funció d'aquella. Aquesta restauració es pot fer en forma de proteïna (teràpia substitutiva o de reemplaçament), o a nivell genètic (teràpia gènica). L'inconvenient per aquest darrer enfocament és la grandària d'aquestes subunitats i el límit dels vectors més utilitzats en l'actualitat a la clínica, els vectors adenoassociats (AAV). Per aquest motiu, s'estan provant altres teràpies com ara: (1) (Aoki *et al.*, 2013) (2) (2) CRISPR-Cas9 mediada per AAV per la correcció de defectes d'*splicing* o per l'activació de LAMA1 (Kemaladewi *et al.*, 2019) (3) (3) combinació de proteïnes de com la mini-agrina o la $\alpha LNNd$ (Qiao *et al.*, 2005, 2018) (4) reemplaçament amb L111 (Van Ry *et al.*, no date) (5) fàrmacs com l'omigapil, losartan, prednisolona o bortezumib, que inhibeixen l'apoptosi, redueixen la fibrosi, i inhibeixen la inflamació o el proteosoma, respectivament (Erb *et al.*, 2009; Elbaz *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013).

Alguns dels resultats més prometedors actualment són els obtinguts amb omigapil amb el que el fabricant (Santhera) ja ha iniciat un assaig clínic en humans (Erb *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013). També, fàrmacs com losartan o bortezumib que ja s'han mostrat prometedors en els estudis preclínics en ratolí, i podrien avançar ràpidament a assaigs clínics (Elbaz *et al.*, 2012; Körner *et al.*, 2014). Aquestes teràpies, però, es basen en fàrmacs que no aborden la etiologia de la malaltia, i s'ha de tenir en compte també que poden tenir efectes adversos.

Per tal de poder tractar correctament la patologia probablement serà necessari restaurar la membrana basal del múscul esquelètic i reforçar l'adhesió d'aquest. Com s'ha dit abans, això es podria aconseguir amb teràpia gènica, teràpia de reemplaçament o amb altres enfocaments basats en molècules petites. La teràpia gènica amb cDNA grans representa un gran repte amb els vectors utilitzats actualment en la clínica. Actualment, una de les línies més prometedores és la teràpia de reemplaçament amb L111 recombinant (Jachinta E. Rooney *et al.*, 2012).

Malgrat el progrés en la investigació relacionada amb MDC1A en els darrers anys, segueix sent una patologia greu sense cura. Per això, és necessari fer recerca bàsica, translacional i clínica continuada per arribar a desenvolupar un tractament efectiu.

1.6. Teràpia Gènica

La teràpia gènica es defineix com la modificació genètica de les cèl·lules o teixits per produir un efecte terapèutic. Aquestes modificacions es poden dur a terme en cèl·lules cultivades que s'administren posteriorment al pacient (aproximació *ex vivo*) o impliquen procediments *in vivo* injectant directament el material genètic al pacient, produint-se la modificació genètica dins el subjecte (aproximació *in vivo*) (Kaji and Leiden, 2001), (Thorne *et al.*, 2018).

Hi ha estudis on el material genètic es lliura sense vector. Però l'ADN/ARN no administrat per via intravenosa es degrada ràpidament per les nucleases que es troben a la sang, per tant, és un procés molt ineficient (Kawabata, Takakura and Hashida, 1995). Una possibilitat és utilitzar formes modificades que siguin resistents a les RNAses, com ara els morfolins o els fosforotioats. L'ús de la injecció hidrodinàmica augmenta la possibilitat de l'entrada del material genètic no a la cèl·lula. Es tracta d'una infusió ràpida d'un gran volum de líquid a elevada pressió i velocitat, provocant la permeabilització transitòria de les membranes cel·lulars. Una altra estratègia és l'electrotransfecció, que consisteix en l'aplicació de polsos elèctrics després de la injecció de material genètic de manera que es permeabilitzen les membranes cel·lulars. Aquest procediment s'ha provat en molts òrgans, però els més freqüents són els músculs esquelètics i els tumors (Heilbronn and Weger, 2010; Gómez-Aguado *et al.*, 2020).

Sovint el material genètic és transportat per vectors, que actuen com escuts protectors i permeten el lliurament eficient del material genètic a les cèl·lules (Thorne *et al.*, 2018). Els vectors més utilitzats són els virus, perquè tenen la capacitat natural de transportar àcids nucleics i lliurar-los a les cèl·lules amb altes taxes d'eficiència. Però avui en dia també hi ha diverses plataformes que es basen en vectors no virals i són capaces de realitzar les mateixes funcions (Heilbronn and Weger, 2010).

En els darrers anys la teràpia gènica ha avançat de forma extraordinària en molts àmbits, oferint un tractament etiològic per a un nombre creixent de malalties monogèniques com ara les immunodeficiències primàries, malalties retinianes, l'anèmia de Fanconi, l'hemofília o la atrofia muscular espinal (AME). Es tracta de patologies que presenten característiques que faciliten l'èxit de les teràpies gèniques basades en vectors tradicionals perquè hi ha una avantatge selectiva per part de les cèl·lules transduïdes, perquè el teixit diana és fàcil de transduir o de manipular *ex vivo*, o per altres motius (Dunbar *et al.*, 2018).

Recents avenços en les teràpies d'altres Distrofies Musculars com són l'atrofia muscular espinal (SMA; en anglès *Spinal Muscular Atrophy*) i la DMD demostren la prova de concepte i la viabilitat de la teràpia gènica pel tractament d'aquests trastorns. Malgrat aquests èxits en altres Distrofies Musculars, el lliurament de gens grans als teixits musculars encara presenta reptes addicionals. Com ja s'ha esmentat abans, una de les principals limitacions és la grandària dels gens implicats en moltes d'aquestes distròfies, com és el cas de la deficiència de LAMA2, que contrasta amb la capacitat limitada dels vectors convencionals (4,7 Kb en el cas dels vectors adenoassociats (AAV)). Recentment, el lliurament d'un mini gen que codifica una reduïda versió funcional de la distrofina (micro-distrofina) mitjançant una única administració sistèmica (i.v.; de l'anglès *intravenous*) de vectors AAV tradicionals ha demostrat ser una teràpia eficaç en models animals i es troba en fase III d'assaig clínic actualment (Childers *et al.*, 2014).

1.7. Vectors adenovirals

Hi ha diversos vectors adequats per la teràpia gènica, els més utilitzats a la clínica són els vectors adenoassociats (AAV). Malauradament, la seqüència codificant de LAMA2 és massa gran (gairebé 10 Kb) per a la majoria de vectors convencionals, i les perspectives per reduir-lo mitjançant enginyeria molecular són pobres a causa de l'alta complexitat de la L211 i les seves múltiples interaccions amb altres proteïnes. Hi ha pocs vectors virals que tinguin la capacitat suficient per empaquetar transgens o cDNAs com el de LAMA2 (Gawlik and Durbeej, 2011).

Els vectors adenovirals d'alta capacitat (HC-AdVs; de l'angles, *High-Capacity adenoviral vectors*) també anomenats vectors adenovirals auxiliar dependents (HD-AdVs; de l'angles *Helper-Dependent adenoviral vector*) són una opció prometedora. Estan desproveïts de tots els gens codificants virals i poden empaquetar fins a 36-37 Kb de material genètic (Manuela Gonzalez-Aparicio *et al.*, 2011; Brunetti-Pierri *et al.*, 2013). Són vectors no integratius i poden transduir eficientment molts tipus cel·lulars i teixits no proliferatius, incloent el múscul esquelètic o fetge. Al ser un vector no integratiu l'expressió és donarà d'una manera episomal, així i tot es caracteritzen per mantenir l'expressió durant llarg períodes de temps en teixits poc proliferatius (M. Gonzalez-Aparicio *et al.*, 2011; Brunetti-Pierri *et al.*, 2013).

L'absència de gens virals evita el risc de producció residual de proteïnes víriques en les cèl·lules transduïdes, que podrien induir respostes immunes cel·lulars i limitarien la durada de l'expressió transgènica. Aquest va ser el principal inconvenient observat amb els vectors adenovirals de primera generació (FGAdV), en els que només s'havien eliminat les regions E1 i E3 (Piccolo and Brunetti-Pierri, 2014). Tanmateix, els HC-AdV encara tenen limitacions importants. En primer lloc, les càpsides d'AdV provoquen respostes inflammatòries i immunitàries més importants que els AAV i no es poden administrar de manera segura a dosis elevades. A més, com els AAV i altres vectors que s'utilitzen en la teràpia gènica *in vivo*, la seva eficàcia es veu molt reduïda en individus amb anticossos neutralitzants (NAb) preexistents. A més, de forma similar al que passa amb els AAV, provoquen una resposta humoral després de l'administració sistèmica, impedit la possibilitat de noves re-administracions. La producció d'HC-AdV normalment depèn d'un virus auxiliar FGAdV *helper virus* (HV), que s'ha d'eliminar completament del vector final. La fabricació industrial d'HC-AdV en condicions GMP encara no està disponible, però les recents millores en la seva producció han convertit als HC-AdV en una opció factible per la teràpia gènica. Finalment, els AdV activen moltes vies immunitàries innates i, per tant, han estat eines ideals per estudiar immunitat innata contra els virus. De fet, el seu ús com a vectors de teràpia gènica per a malalties hereditàries ha disminuït en gran mesura i actualment s'utilitzen en la vacunació (p.e. pel SARS-Cov-2), i en la teràpia gènica del càncer (Cots, Bosch and Chillón, 2013b).

Hi ha diversos serotips de HC-AdVs amb diferents tropismes cel·lulars. En aquest treball hem utilitzat el serotip HC-AdV5, que pot transduir de manera eficient diferents tipus de cèl·lules *in vivo*, però té un tropisme especialment elevat pels hepatòcits. Els HC-AdVs tenen un receptor cel·lular específic anomenat CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*), el qual els hepatòcits expressen en gran quantitat, fet que explica el tropisme hepàtic d'aquests vectors (Fechner *et al.*, 1999).

1.8. El fetge com a diana terapèutica

El fetge constitueix una diana especialment òptima per a la teràpia gènica. En humans adults té un pes mitjà de 1500 g, i sintetitza i secreta un gran nombre de proteïnes. La majoria de proteïnes plasmàtiques (a excepció de les immunoglobulines) són sintetitzades i secretades per les cèl·lules del parènquima hepàtic. La seva abundant vascularització, el seu endoteli fenestrat i l'alta expressió de receptors per diferents virus a la superfície dels hepatòcits expliquen les altes taxes de transducció que s'observen amb molts dels vectors utilitzats en teràpia gènica després de la seva administració sistèmica. Atès que els hepatòcits adults són quiescents, l'expressió transgènica és generalment a llarg termini, fins i tot amb l'ús de vectors no integratius (Jacobs *et al.*, 2012). Per a la teràpia gènica dirigida a fetge se solen utilitzar promotors hepatoespecífics, de manera que s'impedeix l'expressió transgènica a les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) pel que l'expressió a fetge de neoantigens sigui sovint més tolerogènica que en altres teixits (Mingozzi *et al.*, 2007). En general, la introducció de gens *in vivo* en els hepatòcits s'ha convertit en un dels models més exitosos i prometedors de teràpia gènica en assaigs clínics recents (Baruteau *et al.*, 2017).

El fetge està equipat amb mecanismes eficients per detectar i eliminar patògens (Cots, Bosch and Chillón, 2013a). En particular, els macròfags residents en aquest òrgan (cèl·lules de Kupffer) són especialment eficients en la fagocitosi dels AdV, la qual cosa constitueix una barrera per la transducció d'hepatòcits i també contribueix a les respostes inflamatòries (Pastore *et al.*, 2013). Actualment, existeixen estratègies per l'eliminació de les cèl·lules Kupffer i d'altres macròfags abans de la transducció, com ara l'administració per via endovenosa de clodronat encapsulat en liposomes (Moreno, 2018), que s'utilitza en estudis preclínics.

S'ha demostrat la factibilitat d'utilitzar vectors AdV dirigits al fetge en diferents models preclínics, com ara en babuïns mascles adults. Set anys després de rebre una única dosi de vectors, l'expressió del transgen encara era detectable en sèrum, encara que es va observar un lent descens progressiu. Aquest període de temps en babuïns és més de la meitat de la seva vida, i la petita disminució es podria explicar pel recanvi natural dels hepatòcits. En administrar dosis baixes dels vectors, els anticossos neutralitzants eren indetectables al final de l'observació, cosa que suggereix que en aquests casos seria possible una readministració amb èxit. No es van trobar alteracions significatives en cap òrgan o teixit, suggerint l'absència de toxicitat significativa (Brunetti-Pierrri *et al.*, 2013).

2. Hipòtesis i Objectius

MDC1A és una malaltia d'inici precoç que amenaça la vida causada per mutacions en el gen de LAMA2. Actualment no hi ha opcions de tractament efectives per a la malaltia. La mida del gen LAMA2 supera el límit permès en els vectors virals utilitzats actualment en la pràctica clínica pel que es necessària crear estratègies alternatives. Les principals hipòtesis d'aquest treball són:

H1. La L211 pot ser sintetitzada i secretada per un teixit o òrgan extramuscular com el fetge. La proteïna viatjarà pel torrent sanguini fins arribar al múscul esquelètic, on es quedarà retinguda, unida als seus receptors.

H2. Els vectors HC-Adv5 contenint la seqüència codificant de la merosina humana són uns vehicles adequats per la transducció eficient del teixit hepàtic murí.

El principal objectiu d'aquest projecte és avaluar una nova estratègia de teràpia gènica (TG) per a la distròfia muscular congènita de tipus 1A (DMC1A) o deficiència de merosina utilitzant estratègies dirigides a teixits extramusculars. Més concretament, els objectius són:

O1. Analitzar si mitjançant una administració sistèmica de L211 aquesta es localitza a múscul esquelètic.

O2. Determinar si els hepatòcits expressen les diferents subunitats de la L211, necessàries per la formació del trimer.

O3. Analitzar si l'expressió forçada de LAMA2 als hepatòcits permetrà la formació de trímers de L211 funcionals.

O4. Disseny i producció de vectors virals amb la seqüència codificant de la merosina humana.

O5. Validació de vectors virals amb la seqüència codificant de la merosina humana en models rellevants tant cel·lulars com en models murins de la malaltia.

3. Material i mètodes

3.1. Tractaments

3.1.1. Proteïna recombinant

Es va adquirir L211 humana recombinant (LMN211rh; BioLamina, Suècia) marcada amb un flag-tag.

Es va descongelar ON a 4°C i va ser dialitzada utilitzant membranes poroses, per tal d'eliminar l'azida sòdica, i concentrada 10x amb filtres Amicon (Merck Millipore) per tal de resuspendre-la en PBS a una concentració adequada per la seva administració als ratolins. Aquest procediment es va realitzar just abans de procedir a la seva injecció dels animals, i es va mantenir en tot moment a 4°C. D'aquesta manera s'evitaven els cicles congelació-descongelació que poden influir en la funcionalitat de la proteïna.

3.1.2. Eines genètiques: Disseny i generació de plasmidis i vectors.

3.1.2.1. Disseny dels plasmidis

Els plasmidis amb la seqüència de LAMA2 humana amb i sense una cua d'histidines al seu extrem carboxi-terminal (HisTag), es van dissenyar a mida i es van obtenir comercialment (GenEZ ORF Clons, GenScrip), es van anomenar pc-LAMA2 i pc-LAMA2-H respectivament. Els plasmidis són de propagació en bacteris amb seqüències dissenyades per tal de facilitar el clonatge i generar el vector final. Contenen la seqüència codificant de la subunitat LAMA2 humana (9369 pb) sota el promotor del citomegalovirus (CMV), per la qual cosa tindrà expressió ubíqua en cèl·lules eucariotes.

Es va utilitzar la seqüència codificant per la LAMA2 humana i no la de ratolí pel fet que en anteriors estudis realitzats per W. Kuang *et al.* en un model transgènic es va descriure que la proteïna híbrida formada per les subunitats $\alpha 2$ humana i la $\beta 1$ i $\gamma 1$ murines és una proteïna funcional que reverteix el fenotip (Kuang *et al.*, 1998). A més, d'aquesta manera podrem tenir una proteïna que es podria diferenciar de la forma endògena que produeixen els ratolins model de forma residual. A més, en cas d'obtenir resultats positius ens podria ajudar a fer una translació a pacient de manera més ràpida.

Per tal de dirigir l'expressió del transgen exclusivament als hepatòcits es van clonar les seqüències codificants de LAMA2 humana del plasmidi pc-LAMA2 i pc-LAMA2-H a un plasmidi que conté el promotor de l'alfa1-antitripsina amb l'*enhancer* de l'albumina - EA1bAAtp (EAAT). Aquest plasmidi resultant l'anomenarem pAsc-EAAT-LAMA2 i pAsc-EAAT-LAMA2-H. Aquests plasmidis contenen l'esmentat promotor, que assegura una expressió robusta i específica en els hepatòcits (Kramer *et al.*, 2003), el cDNA complet de LAMA2 humana (amb o sense cua d'histidines) i un senyal de poliadenilació. A més, aquests vectors compten amb dianes de

restricció Ascl que ens permeten la introducció dels elements abans esmentats en el plasmidi víric que serà introduït en el vector i que consta dels elements necessaris per a la replicació viral, com ara el senyal d'encapsidació, els ITRs, F1 ori. Aquest darrer plasmidi és introduït en el vector viral i l'anomenarem pD23-EAAT-LAMA2 i pD23-EAAT-LAMA2-H.

La clonació dels plasmidis es va realitzar al laboratori del Dr Rubén Hernández i Manuela González del grup de Teràpia gènica i regulació de l'expressió gènica de CIMA de la Universitat de Navarra.

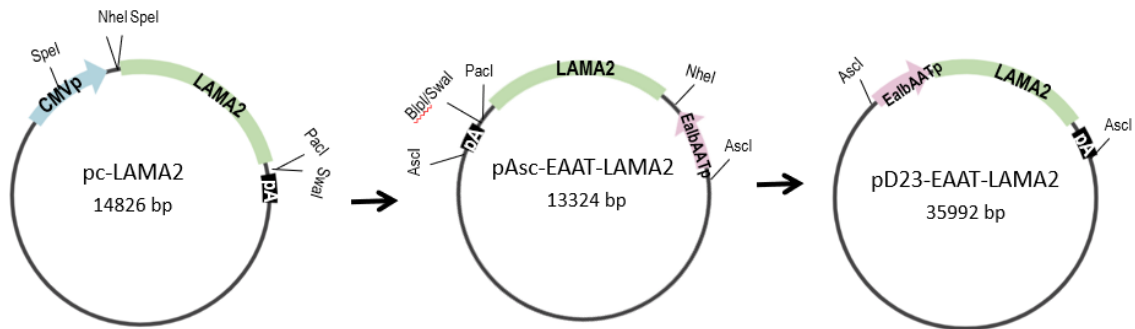


Figura 2.3. Esquema explicatiu de les etapes de clonació per obtenir el plasmidi codificant per la LAMA2 al vector HC-AdV5. Per al plasmidi amb el HisTag es va seguir el mateix procediment partint del plasmidi pc-LAMA2-H.

3.1.3. Disseny i producció HC-AdV5

Els vectors HC-AdV5 tenen prou capacitat per poder introduir tota la seqüència codificant de LAMA2 humà i la resta d'elements presents al plasmidi pD23-EAAT-LAMA2 o pD23-EAAT-LAMA2-H.

L'obtenció i producció de les partícules adenovirals la va realitzar el grup de l'Universitat de Navarra. Per tal d'assolir les partícules virals del vector, el plasmidi proviral linealitzat es va transfectar en cèl·lules empaquetadores (HEK-293) coinfectades amb un adenovirus auxiliar (HV; en anglès helper virus). El HV és el que proporciona totes les proteïnes reguladores i estructurals necessàries per a l'amplificació i empaquetament de l'HC-AdV. S'utilitzarà un HV auto-inactivable específicament dissenyat per evitar contaminació al producte final (M. Gonzalez-Aparicio *et al.*, 2011). Després de diverses rondes d'amplificació, el vector es va purificar mitjançant gradient de densitat (clorur de cesi).

3.1.4. Producció i aïllament plasmidi

Els plasmidis obtinguts en les prèvies seccions es van electroporar en cèl·lules electrocompetents ElectromAX Stbl4 (ThermoFisher Scientific). Les cèl·lules Stbl4 emmagatzemades a -80 °C es van descongelar a 4 °C, es van afegir 50 µl d'aquesta suspensió a un tub de microcentrífuga amb 2 µg del plasmidi a transformar. Es va traspasar a una cubeta

d'electroporació de 0,2 ml prèviament refredada i esterilitzada. L'electroporació es va realitzar en un l'aparell Gene Pulser X cell (Bio-Rad) a les condicions 1.2 kV, 25 µF, 200 Ω. Es va afegir 1 ml de medi S.O.C. (ThermoFisher Scientific) i es va transferir tot a un tub Eppendorf nou d'1,5 mL i s'incubà a 200 rpm, 30 °C durant 90 minuts. A continuació, les cèl·lules Stbl4 transformades es van cultivar en una placa de Petri i/o es van glicerinar pel seu emmagatzematge. Un cop cultivades a una placa de Petri amb medi sòlid de brou de lisogènia (LB; en anglès, *lysogeny broth*) amb Agar (Invitrogen) i l'antibiòtic de selecció corresponent. Es va realitzar una dilució 1:10 de les cèl·lules transformades a sembrar i s'inocularen 250 µl en la placa de Petri amb medi sòlid, es van incubar a 30 °C durant 24-48 hores fins a observar creixement bacterià. D'aquesta manera es va aconseguir creixement només de les colònies bacterianes que s'havien transformat amb el plasmidi a amplificar. A continuació, s'inoculà 1 colònia individual en 5 ml de medi LB líquid amb antibiòtic i s'incubà ON a 30 °C a 250 rpm. El següent dia, 1 ml del cultiu bacterià s'inoculà en 250 ml de medi LB ON a 30 °C a 250 rpm. Finalment, el plasmidi es va aïllar del cultiu mitjançant el kit *PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep* (Invitrogen™) seguint les indicacions del fabricant.

3.1.5. Restricció

La verificació la manca de reordenaments en els plasmidis amplificats i la integritat del vector es va comprovar mitjançant anàlisis de restricció del seu genoma.

Per tal de verificar la manca de reordenaments en els vectors PD23-EAAT-LAMA2 i PD23-EAAT-LAMA2-H es va utilitzar l'enzim de restricció HindIII (Thermo Scientific™).

3.2. Cultius cel·lulars

3.2.1. Cultius cel·lulars i manteniment

El manteniment de les cèl·lules es va fer en flascons T75 amb 10 ml de medi de creixement complementat amb sèrum.

HepG2 és una línia cel·lular de càncer de fetge humà. El medi de creixement és DMEM High Glucose suplementat amb 10%FBS i 1% PSF (Biowest).

M17 és una línia cel·lular de neuroblastoma humà. El medi de creixement és Opti-MEM (Gibco™) suplementat amb 10%FBS, 1% L-Glutamina i 1% PSF (Biowest).

TPH-1 és una línia cel·lular monocítica humana derivada d'un pacient amb leucèmia monocítica aguda. El medi de creixement és RPMI (Corning®) suplementat amb 10% FBS, 1mM mercaptoethanol, 1mM Piruvat, 2mM L-Glutamina, 1mM HEPES i 1% PSF (Biowest).

AML12 és una línia cel·lular d'hepatòcits de ratolí transgènic per la TGF alfa humana. El medi de creixement és DMEM/F12 en proporció 1:1 suplementat amb 10%FBS, 40 ng/ml Dexametasona (ThermoScientific), 40 ng/ml ITS Supplement (Capricorn Scientific®) i 1% PSF (Biowest).

NIH3T3 és una línia cel·lular fibroblàstica de ratolí. El medi de creixement és DMEM high glucose suplementat amb 10% de Serum adult bovi (ABS; en anglès adult bovine serum) i 1% PSF (Biowest).

J744 és una línia cel·lular monocítica de ratolí. El medi de creixement és OptiMEM/F12 (Gibco, Biowest) proporció 1:1 suplementat amb 20% FBS, 1% L-Glutamina i 1% PSB (Biowest).

Cada 48-96 hores, depenent de la confluència i la velocitat de creixement, les cèl·lules es van dividir en els següents ratios 1:4-1:6 (HepG2, THP-1, AML12 i J774) i 1:10-1:20 (M17 i NIH3T3).

Els protocols seguits per congelar, tripsinització i recompte cel·lular son els mateixos seguits a capítol 1 apartat 3.1.1.

Els hepatòcits primaris aïllats humans i de ratolí i els organoids de fetge humà i de ratolí van ser un obsequi del Dr. Pau Sancho Sancho el grup de recerca "*Liver cell plasticity and tissue repair*" de l'Hospital Clínic de Barcelona. Els hepatòcits humans van ser obtinguts per Cytes Biotechnologies, S.L i els organoids de fetge humà van ser generats a partir d'una biòpsia hepàtica d'un pacient amb hepatitis alcohòlica, i el de ratolí va ser aïllat d'un extracte de fetge de ratolí C57BL/6 wt (normal) i cultivats durant 6 hores. El Dr. Pau Sancho ens van proporcionar directament l'RNA extret d'aquests cultius.

3.2.2. Transfecció amb Lipofectamina

Les cèl·lules HepG2 i AML12 es van sembrar en plaques de 6 pous , plaques de 12 pous o T75 amb la densitat adequada testada anteriorment. L'endemà, els plasmidis PD23-EAAT-LAMA2 i PD23-EAAT-LAMA2-H es van transfectar mitjançant Lipofectamina™ 3000 (Invitrogen™) en una proporció 1:1,5 seguint les instruccions del fabricant.

El medi es va substituir per medi de creixement a les 24 hores després de la transfecció. Les cèl·lules es van incubar durant 48 hores a 37 °C abans de l'aïllament d'ADN i ARN. Per a l'anàlisi per Western blot, 48 hores després de la transfecció es van cultivar en medi de creixement amb reducció al 5% FBS o sense sèrum. Les proteïnes es van recollir el dia 4 i 6 després de la transfecció.

3.2.3. Transducció amb AdV5

Els vectors AdV5 que contenen els plasmidis PD23-EAAT-LAMA2 i PD23-EAAT-LAMA2-H es van testar *in vitro* en cèl·lules HepG2 per avaluar la seva eficàcia i expressió del vector. Les cèl·lules transduïdes es van analitzar després mitjançant qPCR (vegeu secció 3.6 i 3.7).

Es van testar diferents factors de multiplicitat d'infecció (MOI) que es defineix com el nombre de vectors per cada cèl·lula diana presents en el moment de la transducció. La quantitat de vectors a utilitzar es va calcular mitjançant la fórmula següent:

$$\text{Número de partícules virals (vg)} = \text{MOI} \times \text{número de cèl·lules sembrades}$$

El dia anterior a la transducció, es van sembrar les cèl·lules HepG2 en plaques de 12 pous a una concentració de 4×10^5 cèl·lules/pou. El medi es va eliminar i es va afegir medi amb la quantitat de vectors desitjada per les MOI testades. Es va reduir la quantitat de medi a utilitzar durant les primeres 24 hores, el suficient perquè les cèl·lules quedessin cobertes i no s'evaporés, d'aquesta manera augmentarem el contacte de les partícules virals amb les cèl·lules sembrades. Després

de 24 hores es va canviar el medi de creixement i 48-72 h més tard es van recollir les cèl·lules per extreure el DNA i l'RNA.

3.3. Procediments animals

Tots els procediments amb animals es van realitzar d'acord amb les normes institucionals, que segueixen els requisits establerts pel Govern d'Espanya i la Comunitat Europea (BOE 67, 18/3/88, RD 223/1988 y BOE 256, 2/10/90) i van ser aprovades pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal institucional (FUE-2021-01948667 i ID SONNMCN8Y).

3.3.1. Model murí

Es va utilitzar el model murí de distrofinopatia Dy^{2j}/Dy^{2j} (C57BL/6J-Lama2dy-2j) i el seu respectiu control (C57BL/6J) que van ser cedits pel grup de Dr. Marc Güell (*Translational Synthetic Biology*, UPF, Barcelona).

Els progenitors heterozigots $Dy^{2j/+}$ del model murí es van obtenir de Jackson Laboratories i posteriorment es van fer criar. Es va genotipar la descendència dels creuaments dels animals heterozigots per tal d'identificar i aïllar els animals homozigots Dy^{2j}/Dy^{2j} . La seva estabulació i genotipació es realitzà al grup de Dr. Marc Güell (*Translational Synthetic Biology*, UPF, Barcelona).

3.3.2. Condicions d'habitatge i experimentació

Els ratolins es van mantenir a l'estabulari del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona sota condicions de temperatura i humitat controlades amb cicles de llum-fosc de 12 hores. L'alimentació i l'aigua la van disposar *ad libitum* d'acord amb la normativa. Per fer aquest treball es van utilitzar indistintament femelles i mascles.

Per acomodar els ratolins quan començaven a mostrar paràlisi de les extremitats posteriors al voltant de les tres setmanes de vida, es disposava de l'alimentació al terra de les gàbies i l'aigua es posava en forma d'hidrogel també al terra de la gàbia. D'aquesta manera ens asseguràvem que tot i les possibles limitacions de moviment poguessin tenir alimentació i hidratació assegurades. En cap moment es va privar d'alimentació, aigua o socialització.

3.3.3. Injecció intraperitoneal de proteïna recombinant

L'administració intraperitoneal permet una ràpida reabsorció de grans volums de substàncies i és la via d'injecció majoritàriament escollida per a solucions isotòniques no irritants. Per a realitzar l'administració intraperitoneal es va subjectar el ratolí amb una mà i es va inclinar el cap per darrere per exposar l'abdomen. Es va introduir l'agulla en un angle poc profund a través de la musculatura abdominal inferior esquerra. Es va retreure lleugerament l'èmbol de la xeringa abans de la injecció per observar si hi havia líquid o sang, ja que indicaria penetració d'òrgans

peritoneals o vasos sanguinis. En aquest cas caldria extreure l'agulla i tornar-la a col·locar. Les injeccions es van fer lentament però de manera constant.

Es van injectar i.p. sis ratolins Dy^{2j}/Dy^{2j} de dos mesos d'edat amb 250 μ l de LMN211rh a 0,2 μ g/ μ l. Com a control es van injectar tres ratolins Dy^{2j}/Dy^{2j} de la mateixa edat amb 250 μ l de PBS. Els animals es van sacrificar dues setmanes després de la injecció.

3.3.4. Injecció hidrodinàmica

El lliurament de gens mitjançant injecció hidrodinàmica via plex venós retro-orbital és un mètode eficient per la transfecció d'ADN plasmídic nu *in vivo* al fetsge murí (Yan *et al.*, 2012).

Es va diluir el plasmidi en solució salina (0,9% NaCl) a una concentració final de 10 μ g/ml. Es va carregar la solució en una xeringa de 2 ml amb agulla de 32 g calculant que el volum total ha de ser el 7% del pes de ratolí. Els animals es van anestesià amb isoflurà durant tot el procediment per evitar l'estrès per manipulació i assegurar que romanguin quiets per la realització de la injecció de l'agulla que es col·locava en l'espai retroorbital (darrere del globus ocular). Una vegada anestesiats, els ratolins es col·locaven en decúbit lateral i es posaven el dit polze i índex a cada costat de l'ull de l'animal per estirar la pell i fer sobresortir lleugerament l'ull del ratolí. L'agulla s'introduïa amb cura a la base de l'ull de l'animal fins arribar a l'espai retrobulbar. A continuació es realitzava la injecció de manera ràpida, en menys de 7 segons. Una vegada injectats, els animals es retiraven de l'anestèsia i es mantenien en observació fins a la seva completa recuperació. En cas parada cardíaca s'efectuava massatge cardíac extern.

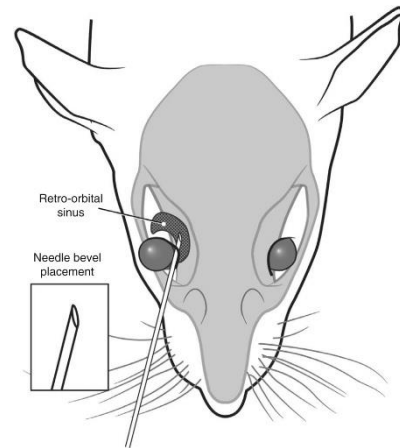


Figura 2.4. Esquema de la col·locació correcta de l'agulla en relació al sinus retroorbital, el globus ocular i la part posterior de l'òrbita de l'ull (Yardeni, Eckhaus and Morris, 2011)

La injecció hidrodinàmica es va fer a 4 ratolins C57BL/6J amb el plasmidi PD23-EAAT-LAMA2 i 4 ratolins C57BL/6J amb el plasmidi PD23-EAAT-LAMA2-H. Com a control es van injectar tres ratolins C57BL/6J amb solució salina.

3.3.5. Injecció retro-orbital d'AdV

La via d'administració escollida per la injecció dels vectors va ser la i.v. per la cavitat retro-orbital (Yardeni, Eckhaus and Morris, 2011).

Prèviament a la injecció dels AdV els ratolins van ser tractats amb liposomes de clodronat (LiposomaTM BV, The Netherlands), aquest producte produeix una reducció transitòria de macròfages i cèl·lules de Kupffer. La solució de liposomes s'emmagatzema a 4°C, es va deixar temperar prèviament a la seva utilització. La solució de liposomes es va traspasar a una xeringa d'1 ml amb una agulla de 27 g. Els animals es van anestesià amb isoflurà i es van mantenir en anestèsia durant tot el procediment per evitar l'estrès per manipulació i assegurar que romanguessin quiets durant la injecció. Amb els ratolins en decúbit lateral es posicionaven el dit

polze i índex a cada costat de l'ull de l'animal i s'estirava la pell per fer sobresortir una mica l'ull del ratolí. L'agulla s'introduïa amb cura a la base de l'ull de l'animal i es col·locava a l'espai retrobulbar (darrere del globus ocular). A continuació es realitzava la injecció de la solució de liposomes, 100 µl per cada 10 grams de pes. Un cop fet la injecció retiràvem la xeringa de manera lenta i suau. Quan sortien de l'anestèsia Els animals i es deixaven en observació fins a la seva recuperació.

Els vectors AdV s'administraven 24 hores posterior a la injecció de liposomes de clodronat. La punció retro-orbital es portava a cap de la mateixa manera que hem explicat anteriorment per l'administració de liposomes de clodronat. S'injectava un volum de 50-100 µl amb els diferents AdV. Els ratolins es dividien en 4 grups per cada lot d'AdV. Després de l'administració dels vectors es van sacrificar grups a les 72 h, i als set i catorze dies. En un grup s'administrava clodronat però no AdV (PBS), i aquest grup s'utilitzava com a control.

3.3.6. Test funcionals

Un cop per setmana, es van realitzar estudis funcionals en els animals tractats amb el vector HCA-EAAT-LAMA2 lot 1. Es van realitzar dos assajos funcionals utilitzant els protocols estàndard (SOPs) segons Treat-NMD, Neuromuscular Network (Luca, 2008; Carlson and Carlson, 2014).

El test de suspensió per quatre extremitats (en anglès; Two-limb hanging test) (Carlson and Carlson, 2014) consisteix en avaluar la força i la coordinació de l'animal. Es tracta de suspendre els ratolins d'un filferro elevat a 35 cm aproximadament. Els ratolins es penjen 600 segons i s'examina la seva resistència. Si un ratolí cau abans del límit de 180 segons, es fan dos assajos més, i per l'anàlisi es selecciona el temps més llarg que ha aguantat.

El test de força d'adherència (en anglès; grip test) (Luca, 2008) consisteix en avaluar la força muscular *in vivo* del ratolí aprofitant la tendència de l'animal a agafar-se d'una barra o reixeta metàl·lica horitzontal metre esta suspès per la cua. La barra o quadrícula està connectada a un transductor de força i la força produïda durant l'estirada sobre la barra es pot mesurar repetidament en intervals durant un període experimental.

3.3.7. Eutanasia i recollida de mostres

Al final de l'experimentació, els ratolins eren sacrificats mitjançant CO₂. Es realitzaran les necròpsies i s'extreien el fetge i mostres de múscul esquelètic per fer anàlisis d'expressió transgènica i estudis histopatològics.

Abans del sacrifici s'obtenia una mostra de sang mitjançant punció en la vena submandibular. Aquesta es feia subjectant l'animal de manera que el cap quedés alineat amb el cos, es localitzava la zona mandíbula desproveïda de pel on es troba la vena mandibular. Amb una agulla de 21G, es feia una punció inclinant dorsalment l'agulla 1-2 mm i recollint la sang en un tub amb anticoagulant. El sagnat es detenia aplicant una mica de pressió en el punt de la punxada. Les mostres de sang es van centrifugar 10 minuts a 13.000 rpm a 4 °C i el plasma era separat i conservat a -20 °C fins a la seva utilització.

Seguidament, després del sacrifici s'extreien els dos músculs gastrocnemis (GMG; en anglès *gastrocnemius*). Un es congelava en isopentà i es submergia en OCT™ Compound (Tissue-Teck) col·locat en orientació transversal per la seva posterior congelació en nitrogen líquid. L'altre gastrocnemi es va congelar en nitrogen líquid.

El fetge es va extreure i es va dividir en dues seccions, una secció es va congelar directament en nitrogen líquid i l'altre es va emmagatzemar paraformaldehid 4% fins al seu processament.

També es van guardar en algunes ocasions ulls, pulmons, cor i quàdriceps. Tots els òrgans es van congelar directament en nitrogen líquid.

Totes les mostres congelades en nitrogen líquid es van conservar a -80 °C.

3.4. Tècniques Generals

3.4.1. Extracció genòmica d'ADN i ARN

3.4.1.1. Cultiu cèl·lular

Per a realitzar l'extracció d'ADN i ARN de les cèl·lules en cultiu es va retirar el medi de creixement i es va afegir 0,3-0,4 ml de TRIzol® (Invitrogen) per cada $10^5 - 10^7$ cèl·lules directament a la placa de cultiu per llisar les cèl·lules. Aquests es van desenganxar de la superfície de cultiu mitjançant un raspador cel·lular i es van traspasar a un tub Eppendorf de 1,5 ml. Es va passar la mostra 2-3 vegades per una punta de pipeta de 1000 µl per ajudar a la disrupció cel·lular. A continuació es van seguir les instruccions proporcionades pel fabricant del TRIzol® (Invitrogen). Les mostres es van conservar a -80°C fins a la seva anàlisi.

3.4.1.2. Teixit muscular i fetge

Per a l'extracció a partir de teixit muscular o de fetge primer es va triturar en fred el teixit prèviament congelat en nitrogen líquid i emmagatzemant a -80 °C. La trituració de teixit es va realitzar mitjançant morter de mà prèviament refredat afegint nitrogen líquid. Un cop triturat el teixit completament es recollia el polsim amb l'ajuda d'una espàtula i es recol·lectava en tubs Eppendorf prèviament refredats amb nitrogen líquid. S'afegia 1 ml de TRIzol® per cada 50-100 mg de teixit. Es va passar la mostra a través de xeringues de diferent calibre per homogeneïtzar la mostra fins que aquesta passava per la xeringa de 27 g (BD Microlance™). A continuació es van seguir de nou les instruccions proporcionades pel fabricant. Les mostres es van conservar a -20°C fins a la seva anàlisi.

3.4.2. Quantificació d'ADN i ARN

Es va utilitzar l'espectòmetre Nanodrop 2000 (ND-200, Thermo Scientific) per quantificar i avaluar la puresa de l'ADN i ARN. Es va carregar directament 1 µl de mostra a la superfície òptica de l'aparell i posteriorment es va determinar la concentració d'àcid nucleic.

3.4.3. Extracció de proteïna

La preparació de les mostres es realitza de la mateixa manera que en l'extracció d'ADN i ARN pels teixits. Pels cultius cel·lulars les cèl·lules es van desenganxar de les plaques de cultiu mitjançant un raspador cel·lular (ThermoFisher) directament amb el tampó de lisi a utilitzar.

L'extracció de les mostres es va fer mitjançant homogeneïtzació amb un tampó de lisi RIPA 2% SDS (preparat a partir de Trizma Base, clorur de sodi, SDS, NP-40 i àcid deoxicòlic) amb inhibidors de proteases (Thermo Scientific) i de fosfatases (Roche). Es van passar les mostres a través de xeringues de diferent calibre per homogeneïtzar-les fins que passaven per la xeringa de 27 g (BD Microlance™). Es col·locaven en un agitador a 4°C ON i l'extracte de proteïna era emmagatzemat a -20 °C fins a la seva anàlisi.

3.4.4. Precipitació proteïna

Les proteïnes extracel·lulars recollides del sobrenedants de les cèl·lules transfectades es van recollir per centrifugació a màxima velocitat a 4 °C. Seguidament, es va afegir àcid tricloroacètic (TCA; en anglès trichloroacetic acid) en una proporció 1:4 de TCA:mostra i es va incubar 10 minuts. Després es va centrifugar a 14000 rpm durant 5 minuts i els pellets es van rentar amb 200 µl d'acetona. Aquest procés es va repetir tres vegades. Finalment, els pellets es van assecat i resuspendre en 150-200 µl RIPA 2% SDS amb inhibidors de proteases i de fosfatases. Es van sonicar 3 vegades durant 8 segons a màxima freqüència i es van col·loca en agitador a 4 °C ON. Els extractes de proteïna van ser emmagatzemat a -20 °C fins a la seva anàlisi.

3.4.5. Columna de purificació HisTag

Les proteïnes intracel·lulars i extracel·lulars recollides dels sobrenedants de les cèl·lules transfectades en flascons de T75 amb el plàsmid pD23-EAAT-LAMA2-H es van passar a través d'una columna de purificació HisTag amb la intenció de purificar la proteïna secretada.

Les columnes de purificació utilitzades van ser les columnes His-Column High Density Nickel (6BCL-QHNI-C8, ABT) seguint les instruccions que marca el fabricant.

3.4.6. Quantificació Proteïnes

Veure Capítol 1 apartat 3.3.2. Quantificació de proteïnes.

3.5. Anàlisi Transcriptòmic

3.5.1. Retrotranscripció (RT-PCR)

L'ARN obtingut es transcriu a cDNA mitjançant la tècnica de retrotranscripció. Es parteix de 3 µg d'ARN total i es va afegir 1 µL d'oligoDT a 50 µM (Invitrogen™) i 1 µl de dNTP Master Mix a 10 mM (Meridian Bioscience®) fins a un volum final de 13 µl. Es va incubar al termociclador a 65 °C durant 5 minuts. Posteriorment, es va incubar 1 minut en gel i es va afegir 4 µl de 5x *First Strand*

Buffer (Invitrogen™), 1 µl de DTT a 0,1 M (Invitrogen™), 1 µl RNaseOUT™ (Invitrogen™) i 1 µl SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen™). Es va incubar en el termociclador durant 5 min a 25 °C, 55 min a 50 °C i 15 min a 70 °C. Les mostres es van diluir en H₂O lliure de DNA i RNA a una concentració de 100 ng/µl.

3.5.2. PCR a temps real (RT-qPCR)

Per quantificar l'expressió gènica amb més detall es va realitzar una RT-qPCR. Es van utilitzar 100 ng de cDNA per a cada reacció en una placa de 96 pous de LightCycler® 480 (Roche Diagnostics®). Es van afegir 5 µl de PowerUp Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems™), 3 µM dels primers específics i H₂O lliure de DNA i RNA fins a un volum final d'11 µl. Totes les mostres es van realitzar per triplicat pel gen a analitzar i el gen control utilitzat per normalitzar els valors per la quantitat d'ARN total de cada mostra. A continuació la placa es va analitzar a l'aparell de RT-qPCR LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) equipat amb el programari LightCycler® 480 SW1.5.1 per l'anàlisi dels resultats.

El programa de temperatures utilitzat va ser el següent: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 40 cicles de 15 segons a 95 °C i 1 min a 60 °C (mostres humanes) o a 57 °C (mostres de ratolí), seguits de 10 segons a 95°C i 10 segons a 40 °C. La velocitat de la rampa de temperatura és de 4,4 °C/s en tots els passos excepte en l'adquisició i el pas final que és de 2,2 °C/s.

A partir de les corbes d'amplificació s'obtenen els valors de Ct per a cada mostra. Les dades es van analitzar amb el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En els experiments d'expressió basal, es representa $2^{-\Delta Ct}$ perquè no es disposen de mostres control per comparar.

	Gen	Primer Forward	Primer Reverse	Producte (bp)
Humà	LAMA2	GGCTTATTCAGCTGGCAGAG	ATTCTCCCAGGGACTTTGCT	150
	LAMB1	ATCTTGCAATGAGTTCACGG	TCACACTGTGGCGTCTCAAT	153
	LAMC1	AATCCGTATGGGACCATGAA	TCACACCTCTCACAGCCTTG	149
	GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197
Ratolí	Lama2	TGACAGCAGATGGTGAGCAA	TTATGGCTTCAGCATCCTGG	108
	Lamb1	TGGTGGTCTGGTCACTGTGG	TCGCCTCATCTGCTCTCACT	137
	Lamc1	ACAGTGCCAGTGTCTGCCTC	CATGGCAGTCACACCTCTCG	107
	Gapdh	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	123

Taula 2.2. Llista d'encebadors utilitzats per l'anàlisi de cDNA i RT-qPCR i la seva respectiva longitud del producte amplificat.

3.6. Anàlisi genòmic

3.6.1. PCR a temps real (RT-qPCR)

Per tal de poder quantificar el número de còpies genòmiques relatives de l'insert de LAMA2 i fer la titulació d'AdV5 que conté la còpia exògena de LAMA2 es van realitzar RT-PCR partint de 100 ng DNA o 1 µl d'AdV5. La resta del protocol es duu a terme la mateixa manera que en l'apartat 3.6.2.

Per la titulació de l'AdV5 caldrà portar a cap una recta patró amb diferents concentracions conegudes del plasmidi inserit en què poder extrapolar el resultat obtingut.

	Gen	Primer Forward	Primer Reverse
Humà	LAMA2	GGCTTATTCAGCTGGCAGAG	ATTCTCCCAGGGACTTTGCT
Humà	GAPDH	GCTGCTCACATATTCTGGAGG	GGCAACAATATCCACTTTACCAG
Ratolí	Tfrc	TGGGCACTAGATTGGATACCT	ATGAGCTGACCAGCCACTTC

Taula 2.3. Llista d'encebadors utilitzats per l'anàlisi de DNA per RT-qPCR i la seva respectiva longitud del producte amplificat.

3.7. Anàlisi proteic

3.7.1. Tècnica Western blot

La preparació de la mostra i la tècnica de Western blot es va realitzar seguint el mateix protocol que es descriu als apartats 3.3.3.1 i 3.3.3.2 del capítol 1.

Es van modificar les condicions de la transferència que es va fer durant 2 h a 400 mA a 4 °C. Els anticossos primaris emprats van ser anti-laminin alfa-2 clon 5H2 (MAB1922, Millipore), anti-6His Tag® (Ab213204 Abcam, 1:100.000) i anti-GAPDH (60004-1-g. Proteintech®, 1:10.000).

Com a control positiu es va fer servir 0,2 µg de L211rh (Biolamina™) que es va tractar de la mateixa manera que la resta de mostres.

3.7.2. Immunohistoquímica

Per identificar la localització i la presència de les proteïnes d'interès es va utilitzar la tècnica d'immunofluorescència a les seccions histològiques de múscul murí.

A partir dels músculs gastrocnemis murins, prèviament congelats i integrats en OCT™ (Tissue-Teck), es van realitzar seccions mitjançant un criòstat Microm HM505E (ThermoFisher Scientific). El múscul en bloc d'OCT™(Tissue-Teck) es va col·locar sobre la platina adherent-ho amb OCT™(Tissue-Teck). Es van fer seccions seriades de 10 µm i es van recollir en porta-objectes recoberts de poli-L-lisina (VWR). Les seccions es van guardar a -80 °C fins a la seva utilització.

Per la immunohistoquímica es van temperar els portaobjectes durant 15 minuts i es van envoltar les seccions amb DAKO pen (Dako). Les seccions del teixit es van fixar amb paraformaldehid al 2% durant 5 minuts a RT. Es van incubar durant 1 hora amb solució de bloqueig composta de 5% BSA i 5% de GS en PBS1x:Tritó 0,1%. Incubar amb l'anticòs primari de conill anti-laminin-2 (orb416835 Biorbyt, 1:250), anti-FLAG BioM2 (F9291 Sigma, 1:1000) dissolts en solució de bloqueig ON a 4 °C. A continuació es van rentar amb la solució de PBS-T durant 10 minuts tres vegades i es va incubar amb l'anticòs secundari marcat amb fluorescència a les fosques a temperatura ambient durant una hora. Els anticossos secundaris contra conill utilitzats van ser anti-rabbit Alexa Fluor 594 (A11012 Invitrogen; 1:250) i contra estreptavidina conjugada a FITC (#11-4317-87 eBioscience, 1:1000). Es va rentar 3 cops durant 10 minuts amb PBS-T i es van muntar els cobreobjectes aplicant una gota de *Vectashield Mounting Medium* amb DAPI (Vector Laboratories). Es van recollir imatges representatives capturades amb un microscopi de fluorescència Olympus IX71.

3.7.3. Espectrofotometria de masses (MS)

L'espectrofotometria o espectrometria de masses (MS) és una tècnica analítica que es fa servir per mesurar la relació massa-càrrega d'ions. Els resultats es presenten com un espectre de masses, una gràfica d'intensitat en funció de la relació massa-càrrega. Normalment, es poden emprar per identificar compostos desconeguts mitjançant determinació del pes molecular, per quantificar compostos coneguts i per determinar l'estructura i les propietats químiques de les molècules.

La tècnica MS es va realitzar al Servei de Proteòmica de l'Institut d'Oncologia Vall d'Hebron (VHIO).

3.7.3.1. Preparació de mostres

Les mostres a analitzar es preparen de la mateixa manera que per realitzar la tècnica de Western blot (veure capítol 1 apartat 3.3.3.1). Seguidament, es van fer córrer per un gel d'acrilamida del 8% i es van retallar les bandes del pes molecular escollit a analitzar, que es van emmagatzema a 4°C fins a la seva anàlisi.

3.7.3.2. Digestió *in-gel*

Les bandes de proteïnes d'interès tenyides de plata es van tallar en trossos petits i es van destenyir afegint 200 µl de ferricianur de potassi a 30mM, tiosulfat de sodi a 100 mM durant 20 minuts a temperatura ambient. A continuació, les peces de gel es van rentar tres vegades amb aigua. Es van digerir les proteïnes del gel mitjançant tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WI). El gel fragmentat es va rentar primer amb 200 µl de bicarbonat d'amoni a 50mM / 50% etanol durant 2' minuts i posteriorment es va deshidratar amb 200 µl d'etanol durant 20 minuts. Seguidament, es va realitzar una reducció mitjançant l'incubació de les mostres amb 200 µl de DTT a 10nM en bicarbonat d'amoni a 50 mM durant una hora a 56°C, i una alquilació amb 200 µl de iodoacetamida a 55mM en bicarbonat d'amoni a 50 mM durant 30 minuts protegit de la llum. Les peces de gel es van rentar amb 200 µl de bicarbonat d'amoni a 25mM durant 20 minuts i es van deshidratar amb 100 µl d'acetonitril durant 10 minuts. Es va afegir fins a cobrir completament les peces 80 µl de tripsina a 2,7 ng/ µl en una solució de bicarbonat d'amoni de 25 mM. Es va fer la digestió amb la tripsina durant tota la nit a 37°C.

L'extracció de pèptids es va dur a terme mitjançant l'adició de 40 µl d'acetonitril seguit d'una incubació durant 15 minuts a 37°C, després es va afegir 200 µl de TFA al 0,2% i es va deixar incubar durant 30 minuts a temperatura ambient.

Els pèptids eluïts es van assecar en un SpeedVac i es van emmagatzemar a -20°C fins a analitzar per espectrofotometria de masses.

3.7.3.3. Cromatografia i anàlisi d'espectrofotometria de masses

Les mostres es van analitzar mitjançant un espectròmetre de masses Orbitrap Eclipse (Thermo Fisher Scientific) acoblat a un EASY-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific). Els pèptids es van carregar directament a la columna analítica i es van separar per cromatografia de fase inversa utilitzant una columna de 50 cm amb un diàmetre interior de 75 µm, embalat amb un espectròmetre de partícules C18 de 2 µm (Thermo Scientific).

Els gradients cromatogràfics van començar amb un 95% de tampó A (0,1% d'àcid fòrmic en aigua) i un 5% de tampó B (0,1% àcid fòrmic en acetonitril al 80%) amb un cabal de 300 nl/min durant 5 minuts i es va anar augmentant gradualment fins al 25% de tampó B i 75% de tampó A durant 52 minuts i després a 40% tampó B i 60% tampó A en 8 min. Després de cada anàlisi, la columna es va rentar durant 10 minuts amb un 10% de tampó A i un 90% de tampó B.

L'espectròmetre de masses es va operar en mode de ionització positiva amb la tensió de *nanospray* establerta a 2,4 kV i temperatura de font a 305°C. L'adquisició es va realitzar en funció de les dades del mode d'adquisició (DDA) i les exploracions MS completes amb 1 microescaneig amb una resolució de 120.000 utilitzant un rang de masses de m/z 250-1400 amb detecció a l'analitzador de masses Orbitrap. Després de cada exploració, els ions més intensos per sobre d'un recompte d'ions de 10.000 van ser seleccionats per la fragmentació. El nombre d'ions precursors seleccionats per a la fragmentació va ser determinat per l'algoritme d'adquisició "*Top Speed*" i una exclusió dinàmica de 60 segons. Es va establir la prioritat per a la selecció de precursors per als valors de massa/càrrega d'una llista d'inclusió construïda amb els ions pèptids LAMA2_HUMAN de més probabilitat de ser observades, segons la base de dades Peptide Atlas. Es van produir espectres d'ions fragmentats mitjançant dissociació de col·lisió d'alta energia (HCD) amb una energia de col·lisió normalitzada del 28% i van ser adquirits a l'analitzador de massa de trampa d'ions.

3.7.3.4. Identificació de proteïnes

Les dades de LC-MS es van analitzar mitjançant el programari Proteome Discoverer (v.2.5. Thermo Fisher Scientific). Les proteïnes es van identificar mitjançant Mascot (v.2.5. Matrix Science) per cercar una base de dades que inclou proteïnes *Mus musculus* a SwissProt més la proteïna LAMA2_HUMAN. Es van cercar els espectres MS/MS amb una tolerància de massa precursora de 10 ppm, tolerància de fragments de 0,5 Da. Es va seleccionar la tripsina com a enzim que permet fins a dos clivatges perduts. La Cisteïna carbamidometilació es va establir com a modificació fixa i l'oxidació de la metionina com a modificació variable. El llindar de significació per a les identifications es va establir en $p < 0,05$ ions mínims puntuació de 20. Les identifications es van filtrar a menys de l'1% de FDR tal com es va avaluar cercant una base de dades *decoy*.

3.8. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant el programari GraphPad Prism 8. Les dades es mostren com a mitjana \pm SD. En l'anàlisi de l'expressió gènica, es va utilitzar T test o Anova per comparar els dos o més grups grups experimentals. Les diferències entre grups es van considerar significatives quan $p < 0,05$ (* $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$).

4. Resultats

4.1. Expressió de L211rh en músculs de ratolins administrats sistèmicament

Per tal de verificar si la L211rh pot arribar eficientment al múscul de ratolins deficients en LAMA2 des d'una localització extramuscular o d'una ruta sistèmica es va administrar intraperitonealment L211rh a 6 ratolins $Dy^{2j/2j}$ i com a control es va administrar solució salina per la mateixa via a 3 ratolins $Dy^{2j/2j}$ addicionals. Es van sacrificar als 7 i 14 dies després i es van obtenir els seus gastrocnemis on es va realitzar un marcatge immunohistoquímic contra la subunitat α -2 de la laminina.

A la figura 2.5 podem observar el patró de distribució pericel·lular característic que correspon a la presència de la proteïna humana en la matriu extracel·lular dels ratolins deficients en laminina tractats amb L211rh. Podem observar aquest mateix patró en mostres de biòpsia muscular humana (no deficients en LAMA2), i en canvi, és inexistent en ratolins deficients que només van rebre PBS.

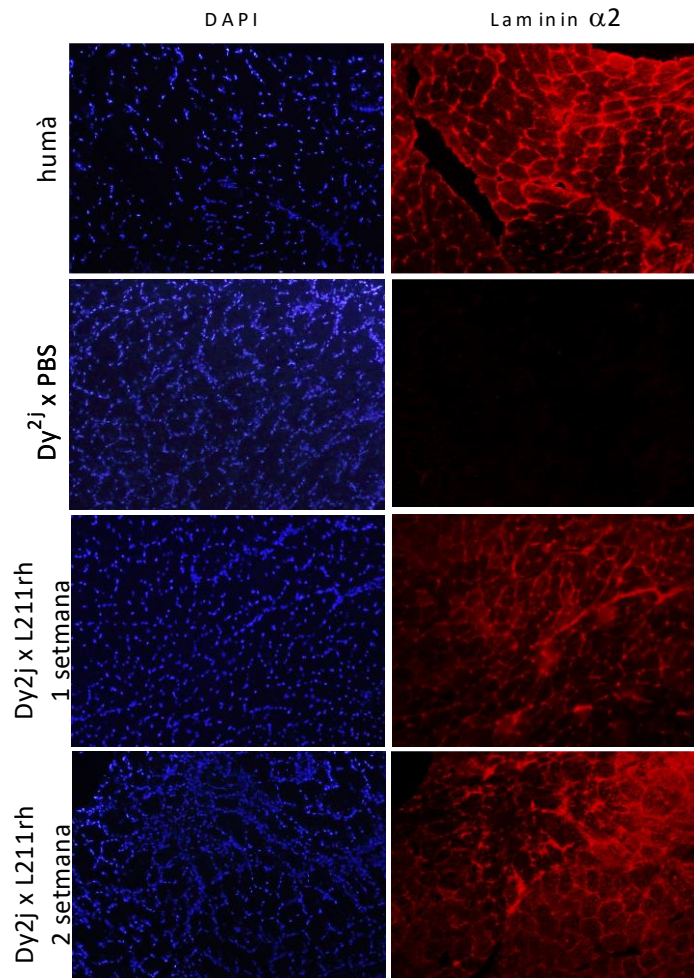


Figura 2.5. Immunohistoquímica de múscul humà i de múscul gastrocnemius de ratolins Dy2j de dos mesos d'edat tractat amb PBS o 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ L211rh. Laminin - $\alpha 2$ va ser detectada amb l'anticòs polyclonal laminin-2 (Biorbyt).

Posteriorment, per tal de verificar la presència de la proteïna recombinant humana en els músculs dels ratolins deficients, es va realitzar una immunohistoquímica contra el epítip FLAG que conté la L211rh. A la figura 2.6 podem observar patró característic que correspon a la L211rh en la matriu extracel·lular dels ratolins deficients en LAMA2 tractats amb la proteïna recombinant. Podem observar que no es detecta L211rh en mostres de múscul humà ni en els ratolins tractats amb PBS.

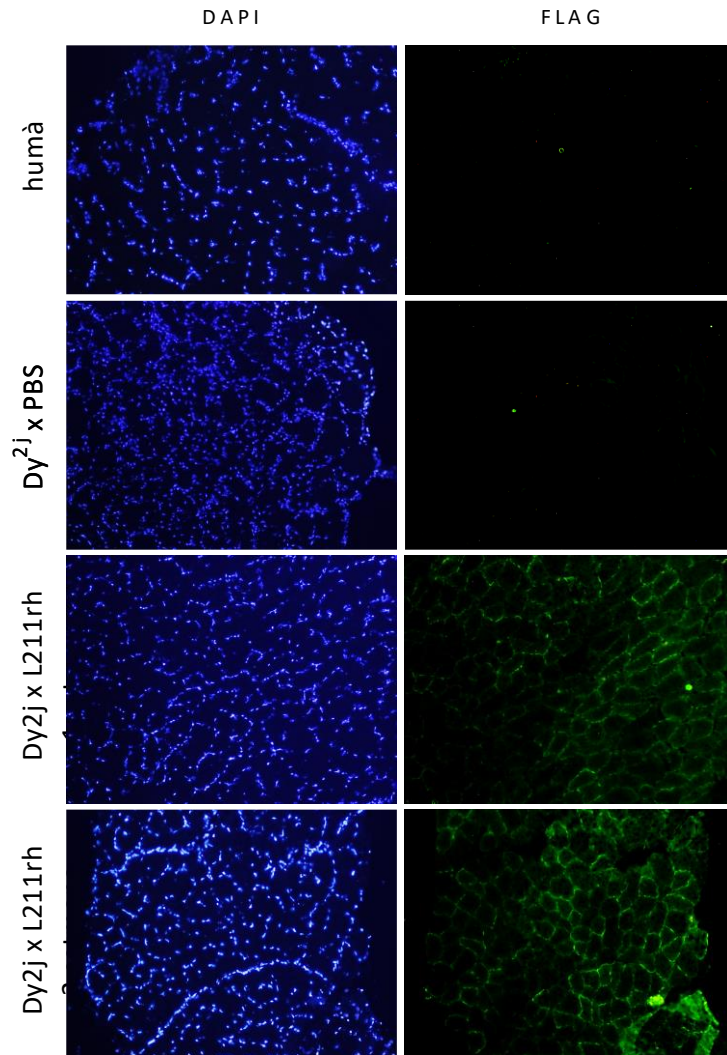


Figura 2.6. Immunohistoquímica de múscul humà i de múscul gastrocnemius de ratolins Dy2j de dos mesos d'edat tractat amb PBS o 0,2 µg/µl L211rh. Laminin-211 va ser detectada amb anticòs anti-FLAG BioM2 (Sigma).

4.2. Expressió de LAMA2, LAMB1 i LAMC1 en línies cel·lulars

Per analitzar l'expressió de les diferents subunitats de la L211 (LAMA2, LAMB1, i LAMC1) a les cèl·lules hepàtiques, es van utilitzar com a model diferents línies cel·lulars murines i humanes mitjançant RT-qPCR. Un dels objectius era trobar al menys un control positiu, amb una alta d'expressió de cadascun d'aquests gens, i un control negatiu, amb expressió molt baixa o absent. Vam seleccionar les diferents línies cel·lulars a estudiar en funció de la seva expressió teòrica documentada en bases de dades (com ProteinAtlas (The Human Protein Atlas, 2022) i BioGPS (BioGPS, s.f.)) i la seva disponibilitat en el nostre entorn.

Com vàrem predir a partir de les bases de dades esmentades, les línies cel·lulars humanes M17 (neuroblastoma) i CACO2 (càncer de colon) tenen una expressió més alta de LAMB1 que les cèl·lules HepG2 (hepàtiques). Tanmateix, l'expressió de LAMC1 va ser més variable. M17 va ser la que va mostrar una expressió d'RNA més alta en ambdós gens, de manera que la vam seleccionar com a control positiu. D'altra banda, tant les cèl·lules HEK293T (fibroblàstica) com les THP-1 (mielomonocítiques) tenien una expressió més baixa d'ambdós gens, però THP-1 era la que mostrava nivells d'expressió més baixos i el vam seleccionar com a control negatiu.

Pel que fa a les línies cel·lulars murines es va confirmar que les cèl·lules NIH3T3 (fibroblàstiques) i J774 (mielomonocítiques) eren útils com a controls d'expressió positius i negatius, respectivament, per aquests dos gens (LAMB1 i LAMC1).

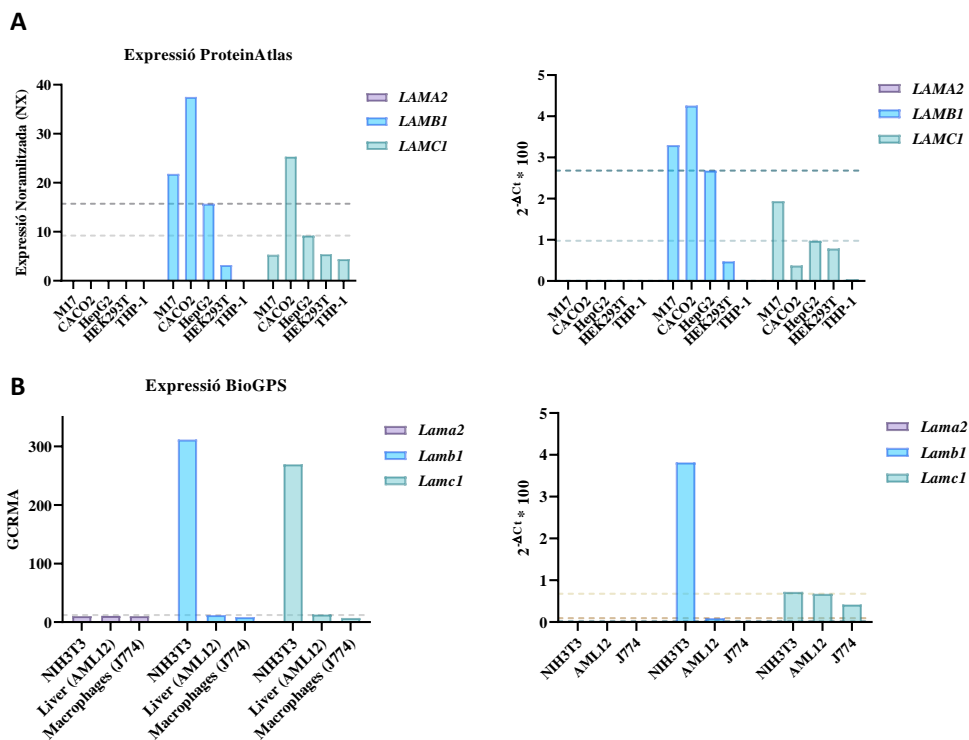


Figura 2.7. Expressió Basal de les diferents subunitats de laminina 211 en diferents línies cel·lulars. (A) Expressió descrita a PorteinAtlas per línies cel·lulars humanes (esquerra) i expressió observada per RT-qPCR (dreta). (B) Expressió descrita a BioGPS per línies cel·lulars de ratolí (esquerra) i expressió observada per RT q-PCR (dreta). Línies cel·lulars: M17: neuroblastoma humà; CACO2: carcinoma de colon humà; HepG2: carcinoma hepatocelular humà; HEK293T: ronyó embrionari humà; THP-1: monocit humà; NIH3T3: fibroblast embrionari de ratolí; AML12: hepatòcits murins; J774: mielomonocític ratolí.

Un cop escollits aquests controls, es va realitzar un anàlisi d'expressió més exhaustiu de les diferents subunitats de les laminines en les línies cel·lulars hepàtiques seleccionades.

Per les HePG2 podem observar com no hi ha expressió significativa de LAMA2, però sí es veu expressió significativament més alta de LAMB1 i LAMC1. Per les AML12 no observem expressió de LAMA2 però sí observem expressió més alta que en els controls per LAMB1 i LAMC1, tot i que no de manera significativa.

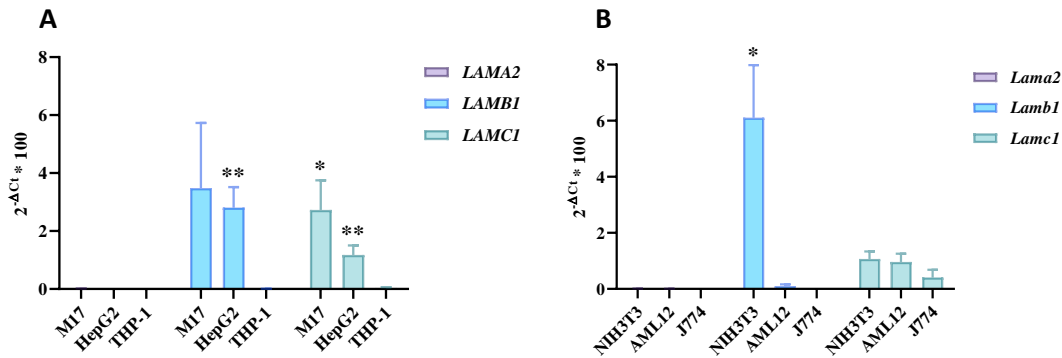


Figura 2.8. RT-qPCR anàlisi de l'expressió basal de les subunitats de laminina 211 en línies cel·lulars hepàtiques comparades amb controls. La significació estadística de cada columna es compara amb els valors de THP-1 i J774 en humans (A) i ratolins (B), respectivament. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001.

4.3. Expressió de LAMA2, LAMB1 i LAMC1 en hepatòcits primaris i organoides de fetge

Després de detectar l'expressió de LAMB1 i LAMC1 en línies cel·lulars hepàtiques, també es va analitzar l'expressió en hepatòcits primaris i organoides de fetge. Això ens permetia determinar si les línies cel·lulars del fetge són realment representatives de l'expressió en hepatòcits primaris. No es va poder fer cap anàlisi estadístic dels resultats, ja que només disposàvem d'RNA procedents de dues mostres d'hepatòcits primaris i una d'organoides.

En tots els casos es va poder detectar l'expressió de LAMC1, tant en hepatòcits primaris humans i murins com en l'organoide hepàtic humà.

D'altra banda, els resultats de LAMB1 van ser més variables, ja que es va poder detectar en l'organoide hepàtic però no en els hepatòcits primaris. En conclusió, la mostra d'organoide hepàtic tenia el mateix patró d'expressió que les nostres línies cel·lulars de fetge, però en les nostres mostres d'hepatòcits primaris, humans i murins, no vam detectar expressió de LAMB1.

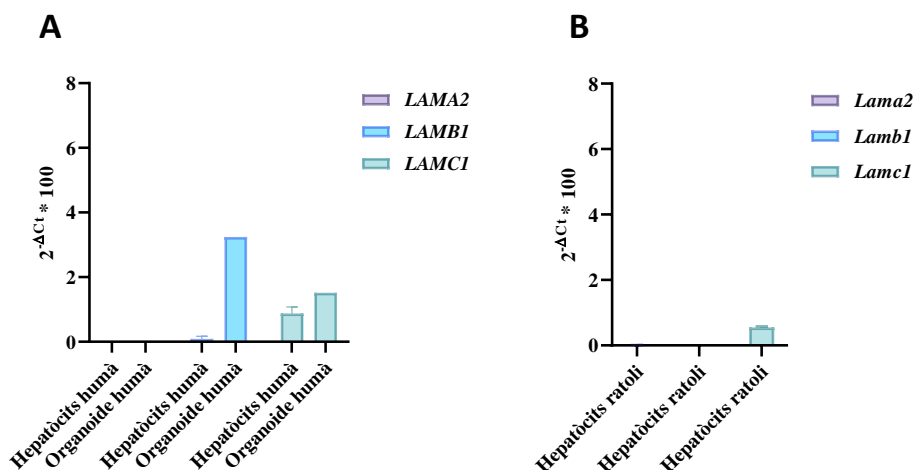


Figura 2.9. Anàlisi qPCR de l'expressió basal de les subunitats de Laminin 211 en hepatòcits primaris i organoides hepàtics d'humans (A) i de ratolí (B). (n=2 per hepatòcits primaris i n=1 per organoides).

4.4. Expressió de PD23-EAAT-LAMA2 i PD23-EAAT-LAMA2-H *in vitro* en cèl·lules transfectades

Per tal de validar les construccions Pd23-EAAT-LAMA2 i PD23-EAAT-LAMA2-H, es va realitzar una transfecció amb lipofectamina en línies cel·lulars hepàtiques humanes (HepG2) i murines (AML12) i es van analitzar els nivells d'expressió de laminina- α 2 mitjançant RT-qPCR. A la figura 2.10 podem observar com LAMA2 s'expressa correctament en ambdues línies cel·lulars amb les dues construccions.

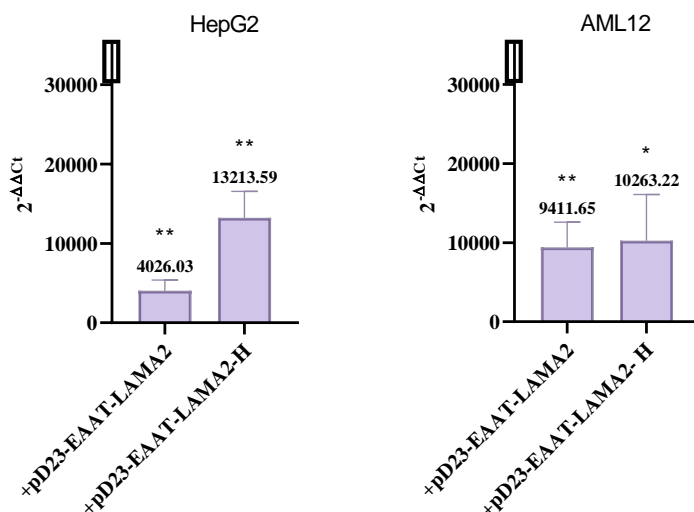


Figura 2.10. Expressió de LAMA2 en cèl·lules transfectades en línia cel·lular hepàtica humana HepG2 (A) i en línia cel·lular hepàtica murina AML12 (B). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Després d'observar una correcta expressió dels constructes, vam analitzar si les línies cel·lulars testades humanes i hepàtiques eren capaces de produir la laminina α 2 i/o el trímer L211. Amb aquesta finalitat, es van transfectar línies cel·lulars HepG2 i AML12, i es va recollir el medi (amb 0% sèrum o 5% sèrum) o les cèl·lules el dia 6 post-transfecció. Es va analitzar la presència de proteïna mitjançant Western blot.

Es van provar diferents concentracions de sèrum en el medi degut a que les concentracions elevades podrien dificultar la detecció de la nostra proteïna i les concentracions sèriques baixes podrien afectar la supervivència cel·lular. A més, la laminina α 2 es pot secretar sola o trimeritzada amb les altres subunitats. Així, en el cas que la proteïna es pogués sintetitzar, podria estar present intracel·lularment, ser secretada sola, o trimeritzada i secretada com a L211 [102]. Per aquest motiu, es van analitzar tant les proteïnes intracel·lulars (Figura 2.11 B) com les extracel·lulars (Figura 2.11 C). No vam detectar laminina α 2 en cap de les condicions testades per les proteïnes transfectades en plaques de 6 pous. En canvi, en les proteïnes transfectades en flascons de T75 vam poder observar intracel·lularment una banda corresponent a ~60 KDa diferencialment expressada per les cèl·lules transfectades respecte el control (Figura 2.11 D).

Per les proteïnes que es van fer passar per una columna de purificació HisTag, no vam poder veure proteïna. També es va realitzar un Western Blot amb anticòs anti-HisTag però no es vam ser capaços de detectar cap proteïna.

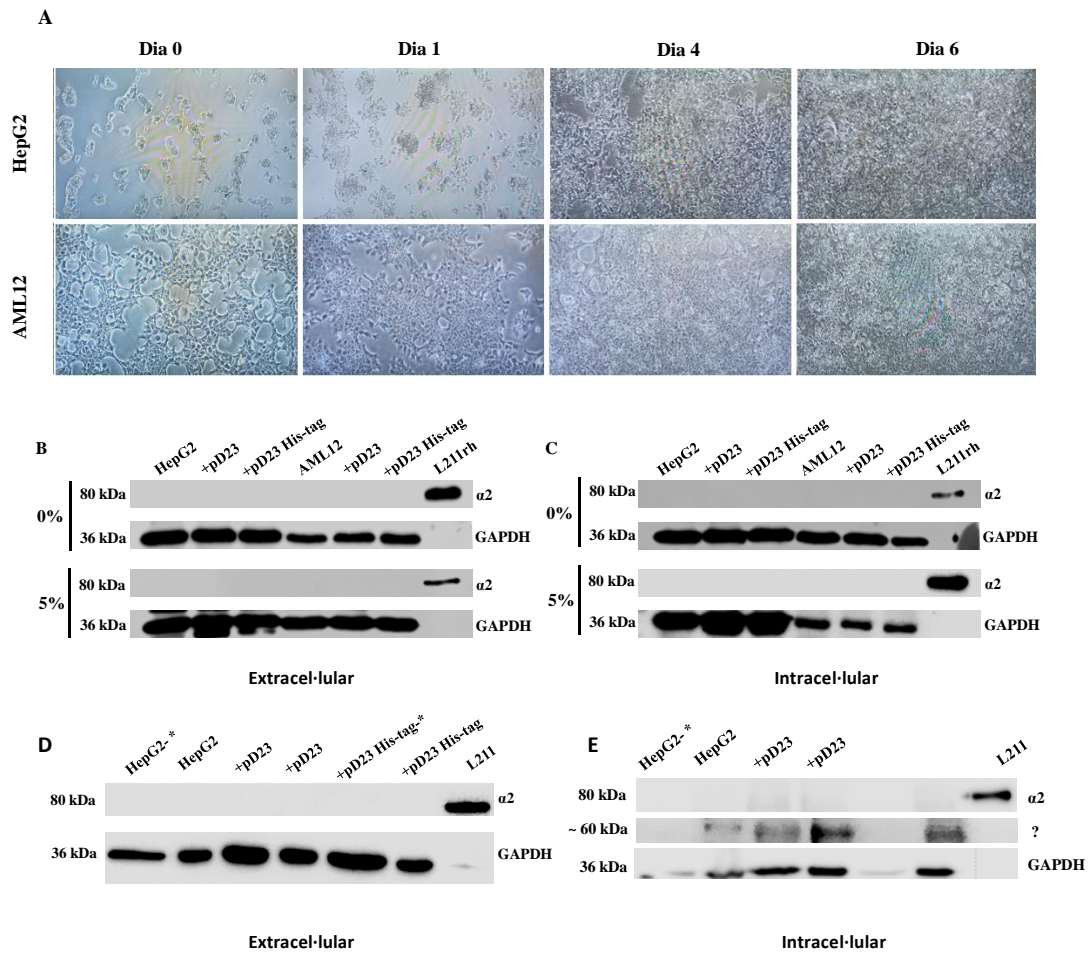


Figura 2.11. Western Blot de l'expressió de laminin 211 en HepG2 i AML12 transfectades. (A) Imatges representatives de microscopi òptic de creixement i viabilitat cèl·lular després de la transfecció. (B) i (C) Proteïnes extracel·lulars precipitades del medi i intracel·lular amb medis amb 0% o 5% FBS en plaques de 6 pous. (D) i (E) Proteïnes extracel·lulars precipitades del medi i intracel·lular amb medis de 5% FBS en flascons de T75. +pD23: pD23-EAAT-LAMA2; +pD23-H: pD23-EAAT-LAMA2-H, L211rh: Laminina recombinant 211 humana de Biolamina; * Proteïna filtrada amb columna HisTag.

4.5. Expressió de PD23-EAAT-LAMA2 i PD23-EAAT-LAMA2-HisTag *in vivo* en ratlins wt i Dy^{2j/2j}

Per tal de validar les construccions Pd23-EAAT-LAMA2 i PD23-EAAT-LAMA2-H *in vivo* es van realitzar administracions hidrodinàmiques dels plasmidis a través de la cavitat retro-orbital a animals wt i DY^{2j/2j}. La injecció hidrodinàmica és una tècnica difícil de realitzar en la que s'administra per via i.v. un volum molt alt de solució salina juntament amb el plasmidi en un període molt curt de temps. És per això, que els primers animals als que es va realitzar van ser wt, degut a que amb els animals deficients en LAMA2 es produïa una taxa de mortalitat molt

alta. Un cop ens vam entrenar en realitzar la tècnica i la vam adequar als nostres aparells i animals, es va poder realitzar la tècnica en animals $Dy^{2j/2j}$ amb una taxa de mortalitat molt més baixa. Finalment, es va realitzar la injecció hidrodinàmica a 3 wt amb el plàsmid pD23-EAAT-LAMA2 lot 2,3 wt amb pD23- EAAT-LAMA2-H i 3 wt que seran utilitzats com a control on es va injectar PBS. De la mateixa manera, es van injectar el mateix número de ratolins pels diferents vectors però amb el model animal $Dy^{2j/2j}$. Tots els animals es van sacrificar als 7 dies després de l'administració del plasmidi.

Els nivells d'expressió de LAMA2 humana (mRNA) es van analitzar mitjançant RT-qPCR. A la figura 2.12 podem veure com l'expressió no es va veure incrementada de manera significativa en cap de les mostres analitzades.

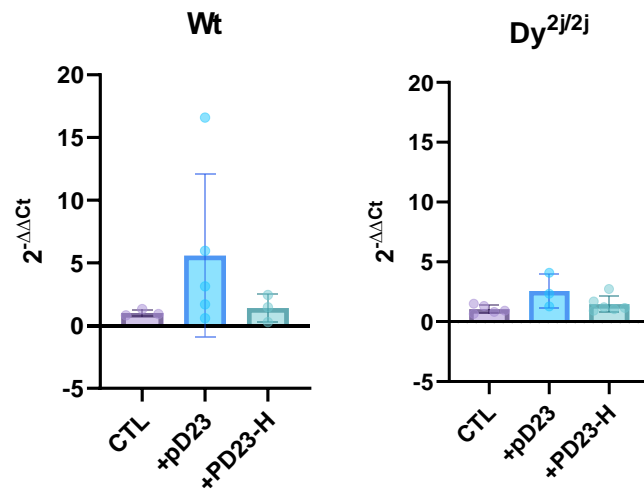


Figura 2.12. Expressió de LAMA2 en ratolins wt (A) i $Dy^{2j/2j}$ (B) on s'ha realitzat hidrodinàmica. CTL: animal control on s'ha realitzat hidrodinàmica amb PBS; pD23: pD23-EAAT-LAMA2; +pD23-H: pD23-EAAT-LAMA2-H

Tot i no trobar diferències significatives, vam decidir estudiar l'expressió de proteïna LAMA2 mitjançant Western blot en teixit hepàtic i muscular i immunohistoquímica en teixit muscular. Es va realitzar però només en el grup d'animals on es va trobar una tendència més alta en els nivells d'expressió en mRNA, els animals wt injectats amb pD23-EAAT-LAMA2. No es va trobar expressió de proteïna LAMA2 a nivell hepàtic o muscular (Veure figura 2.13).

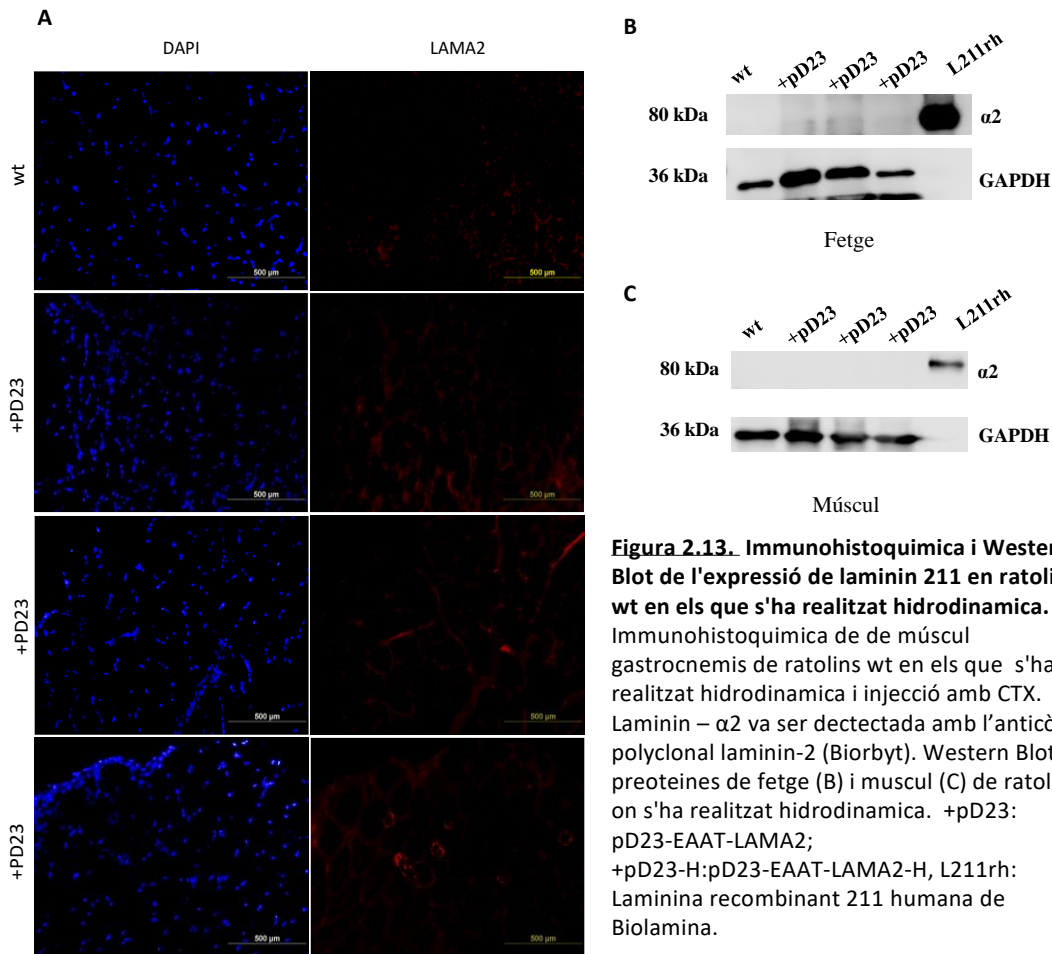


Figura 2.13. Immunohistoquímica i Western Blot de l'expressió de laminin 211 en ratolins wt en els que s'ha realitzat hidrodinàmica. (A) Immunohistoquímica de múscul gastrocnemius de ratolins wt en els que s'ha realitzat hidrodinàmica i injecció amb CTX. Laminin - α 2 va ser detectada amb l'anticòs polyclonal laminin-2 (Biorbyt). Western Blot de proteïnes de fetge (B) i múscul (C) de ratolins on s'ha realitzat hidrodinàmica. +pD23: pD23-EAAT-LAMA2; +pD23-H:pD23-EAAT-LAMA2-H, L211rh: Laminina recombinant 211 humana de Biolamina.

4.6. Quantificació de número de còpies genòmiques de LAMA2 a HC-Adv5

Un cop realitzada la producció de partícules adenovirals amb els plasmidis pD23-EAAT-LAMA2 o pD23-EAAT-LAMA2-H per part de Rubén Hernández y Manuela González del grup de Teràpia gènica i Regulació de l'expressió genòmica de CIMA de la Universitat de Navarra, es van enviar els lots al nostre laboratori. Seguidament es va procedir a realitzar una quantificació del número de còpies genòmiques de l'insert LAMA2 en 1 μ l dels diferents lots de vector HC-Adv5 mitjançant RT-PCR.

Lot	vg/ml
HCA-EAAT-LAMA2 Lot 1	2,0E+02
HCA-EAAT-LAMA2 Lot 2	3,6E+06
HCA-EAAT-LAMA2-H Lot 1	2,9E+07

Taula 2.4. Número de còpies genòmiques de LAMA2 pels diferents Lots de HC-Adv5 mitjançant RT-PCR.

A la taula 2.4. podem veure com pel vector HCA-EAAT-LAMA2 en el lot 1 es va obtenir una titulació molt més baixa que en el lot 2. La titulació més alta ha sigut la obtinguda amb el HCA-EAAT-LAMA2-H.

4.7. Expressió de HCA-EAAT-LAMA2 i HCA-EAAT-LAMA2-H *in vitro*

Per tal de validar l'expressió de LAMA2 en cèl·lules transduïdes amb els vectors HCA-EAAT-LAMA2 i HCA-EAAT-LAMA2-H es van transduïre cèl·lules hepàtiques humanes (HepG2) amb distintes multiplicitats d'infeccions (MOIs). A les 72h es va aïllar mRNA i es va realitzar una RT-PCR per analitzar els nivells d'expressió de laminina – $\alpha 2$.

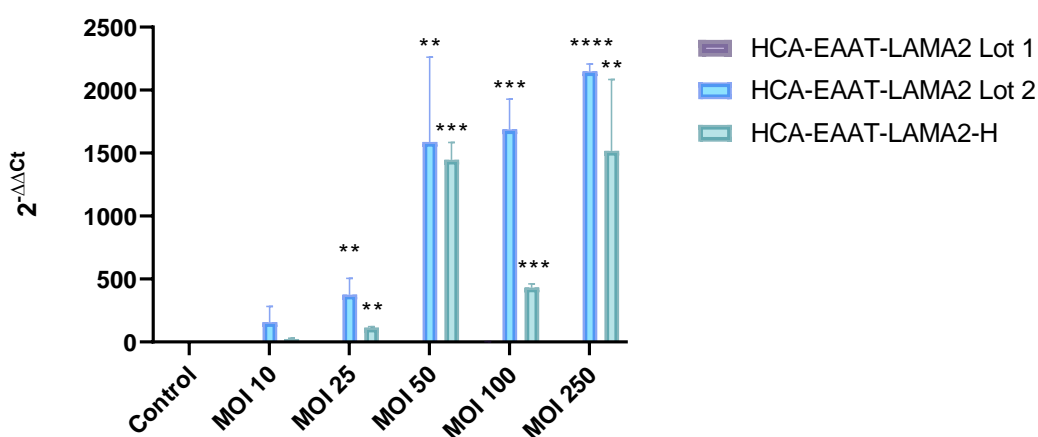


Figura 2.14. Expressió de LAMA2 *in vitro* en HepG2 transduïdes amb HCA-EAAT-LAMA2 i HCA-EAAT-LAMA2-H a diferents MOIs mitjançant RT-qPCR de mRNA. Normalitzada amb GAPDH. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

L'expressió laminina- $\alpha 2$ pel lot 1 de HCA-EAAT-LAMA2 va ser molt baixa i no estadísticament significativa per totes les MOI testades. En canvi, pel lot 2 de HCA-EAAT-LAMA2 i lot 1 de HCA-EAAT-LAMA2-H es va detectar expressió per laminina- $\alpha 2$ a totes les MOI, sent estadísticament significatiu a partir de MOI 25. En ambdós casos es va trobar el pic d'expressió amb la MOI més alta testada que va ser MOI 250.

4.8. Expressió de laminina – $\alpha 2$ en fetge de ratolins tractats amb HC-Adv5 amb LAMA2 humana

Un cop comprovat que *in vitro* vam ser capaços de detectar mRNA almenys amb dos lots de HC-Adv5 es va procedir a realitzar experiments *in vivo*.

Es van realitzar injeccions i.v. dels diferents HC-Adv5 a homozigots $Dy^{2j/2j}$ i controls homozigots $Dy^{2j/2j}$ amb PBS. Els animals van rebre 1% del seu pes en volum de clodronat via intravenosa (i.v) pel plexe periocular 24h abans de la injecció dels vectors per tal d'eliminar transitòriament els macròfags del sistema retículo-endotelial i facilitar-ne la transducció per part dels HC-Adv5. Es van injectar per cada lot de vector testat 3 ratolins amb 50 μ l i 3 ratolins amb 100 μ l de vector HC-Adv5 per i.v. pel plexe periocular. Finalment, es van sacrificar als 7 i 21 dies i es va procedir a la recol·lecció de teixit hepàtic i muscular.

Amb el teixit hepàtic es va realitzar extracció de RNA, DNA i proteïna. Amb el RNA es va realitzar una RT-PCR i posteriorment amb aquest cDNA i amb el DNA genòmic es va realitzar una qPCR on es va detectar l'expressió de transgen LAMA2 humà (veure figura 2.15).

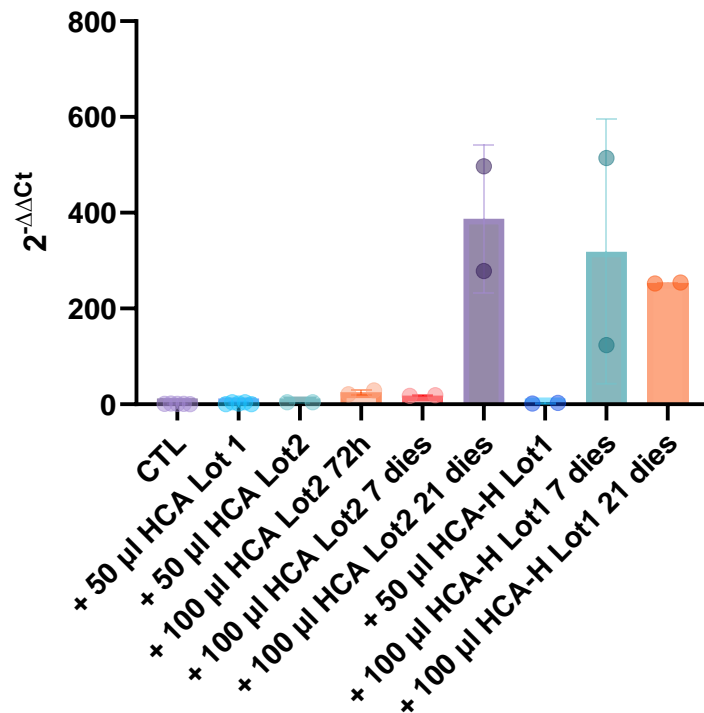


Figura 2.15. Expressió de LAMA2 *in vivo* de fetge dels animals tractats amb HCA-EAAT-LAMA2 (A) i HCA-EEAT-LAMA2-H

Els resultats obtinguts per al vector HCA-EAAT-LAMA2 Lot 1 van ser negatius, no es va poder detectar transgen del vector en cap de les determinacions que vam fer els experiments *in vitro* o *in vivo*, fet que atribuïm a un títol molt baix de vectors presents en aquest primer lot.

Per al vector HCA-EAAT-LAMA2 lot 2 i HCA-EAAT-LAMA2-H vam ser capaços de detectar expressió e transgen als 7 i 21 dies després de la seva administració, tant a nivell de DNA genòmic com de mRNA.

Degut als resultats negatius per HCA-EAAT-LAMA2 lot1, es va decidir analitzar l'expressió proteica només pels vectors HCA-EAAT-LAMA2 lot 2 i HCA-EAAT-LAMA2-H. Amb la proteïna de fetge es va realitzar un Western blot on es va analitzar l'expressió de LAMA2 en aquesta teixits i es va normalitzar amb GAPDH (Veure figura 2.16).

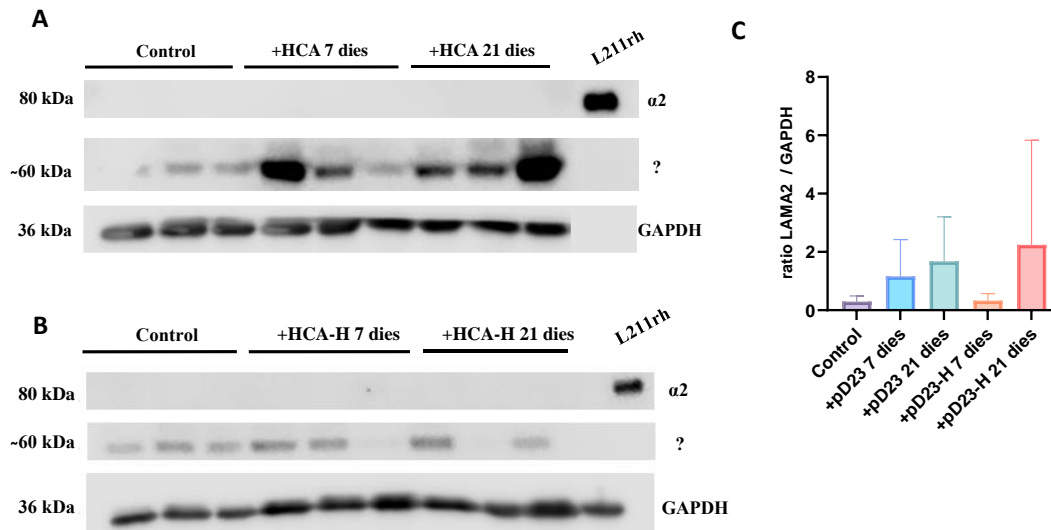


Figura 2.16. Western Blot de fetge dels animals tractats amb HCA-EAAT-LAMA2 (A) i HCA-EAAT-LAMA2-H (B) i la quantificació de la ràtio de la proteïna d'interès respecte el control de càrrega (C). +HCA :HCA-EAAT-LAMA2 Lot 2, +HCA-H: HCA-EAAT-LAMA2-H lot 1, L211rh: laminina recombinant 211 humana de Biolamina.

No es va observar cap banda de la mida esperada (80 kDa) en el WB dels extractes de proteïnes hepàtiques, però es van observar bandes de ~60 kDa en mostres dels extractes de fetge dels animals tractats. Aquesta banda no era específica només dels animals tractats, també es podia veure en els controls $Dy^{2j/2j}$ no tractats. Però com podem veure a la figura 2.14 C, la quantificació en els controls era més baixa que en els animals tractats per la majoria dels grups.

Amb aquests resultats no podem concloure que hi hagi expressió de laminina- $\alpha 2$ al fetge dels ratolins tractats, però, podem dir que el nostre anticòs detecta una proteïna en més quantitat en els ratolins tractats després de 7 i 21 dies.

A continuació, per tal de determinar si la banda de ~60 KDa podria estar relacionada amb l'expressió de laminina- $\alpha 2$ es va analitzar un primer batch de mostres (Veure taula 2.4) mitjançant MS. Es van seleccionar una mostra per cada vector i es va seleccionar la que mostrava més intensitat mitjançant Western blot a la banda de ~60 KDa.

ID	Ratoli	Tractament	
1	WT	Control	
2	$Dy^{2j/2j}$	Control	
3	$Dy^{2j/2j}$	100 μ l HCA-EAAT-LAMA2- H Lot 1	21 dies
4	$Dy^{2j/2j}$	100 μ l HCA-EAAT-LAMA2 Lot 1	21 dies

Taula 2.5. Mostres analitzades per Espectrofotometria de Masses (MS)

A totes les mostres es van identificar al voltant de 1500 proteïnes de ratolí. Només a la mostra amb ID 4 es va identificar un únic pèptid humà que es va determinar que corresponia a LAMA2. La seqüència és específica de la proteïna humana i la Score és de 39, sent aquesta una identificació clara de la proteïna.

4.9. Expressió laminina – $\alpha 2$ en múscul de ratolí tractats amb HC-Adv5 amb LAMA2 humana

Per analitzar si es pot produir, secretar i localitzar L211 al múscul, es van analitzar els músculs extrems dels ratolins tractats amb els diferents lots de vector HC-Adv5.

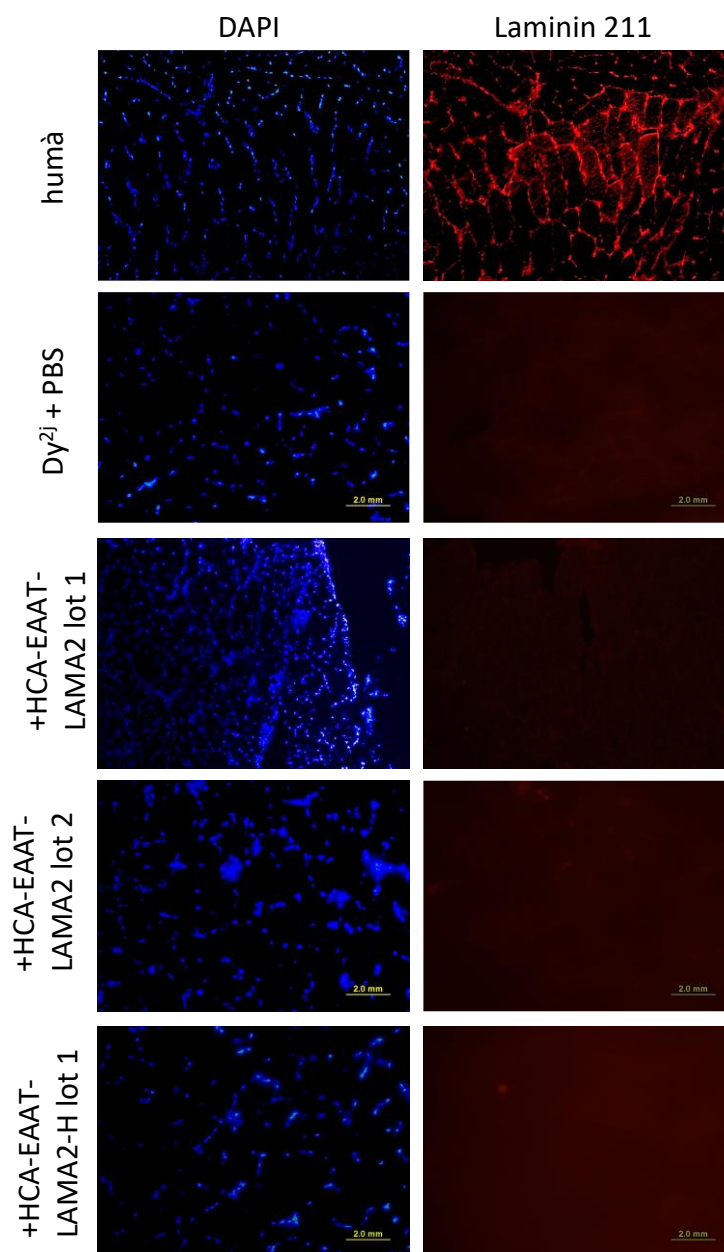


Figura 2.17. Immunohistoquímica de múscul dels animals tractats amb HCA-EAAT-LAMA2 i HCA-EEAT-LAMA2-H.

Es va realitzar una immunohistoquímica als gastronomies de tots els ratolins tractats. El control positiu, un múscul esquelètic humà sa, va mostrar una tinció i localització correcta de la

laminina- α 2 humana, restringida a la membrana basal muscular. En els ratolins controls i tractats no es va detectar laminina- α 2 humana (Veure Figura 2.17).

Seguidament es va analitzar l'expressió de laminina- α 2 humana pels animals tractats amb els vectors HCA-EAAT-LAMA2 lot 2 i HCA-EAAT-LAMA2-H lot 1. On tampoc es va poder detectar laminina- α 2 humana a cap animal tractat.

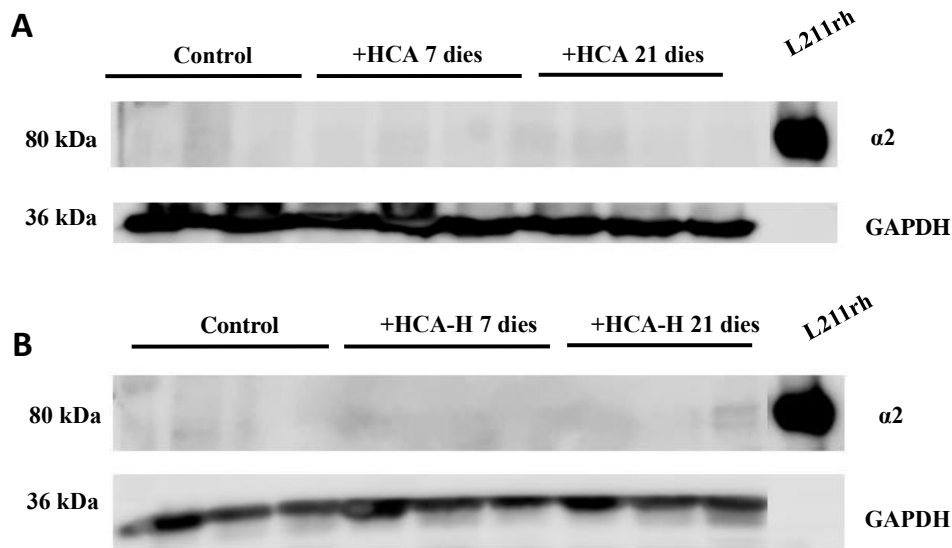


Figura 2.18. Western Blot de muscul dels animals tractats amb HCA-EAAT-LAMA2 (A) i HCA-EAAT-LAMA2-H (B). +HCA :HCA-EAAT-LAMA2 Lot 2, +HCA-H: HCA-EAAT-LAMA2-H lot 1, L211rh: Laminina recombinant 211 humana de Biolamina.

De la mateixa manera que amb el teixits hepàtic, es van enviar les mateixes mostra a analitzar per als mateix animals tractats (veure taula 2.5). A totes les mostres es van identificar al voltant de 400 proteïnes, però a diferència de amb el teixit hepàtic, en el múscul esquelètic no es va identificar cap pèptid per la proteïna LAMA2 humana en cap de les mostres.

4.10. Test funcionals

Els animals tractats amb 100 μ l HCA-EAAT-LAMA2 lot 1 van ser sotmesos a tests funcionals un cop per setmana durant dos mesos. A la figura 2.17 es poden veure els resultats per el test de suspensió per dues extremitats i el test de força d'adherència, en cap dels casos podem observar una millora fenotípica dels animals tractats.

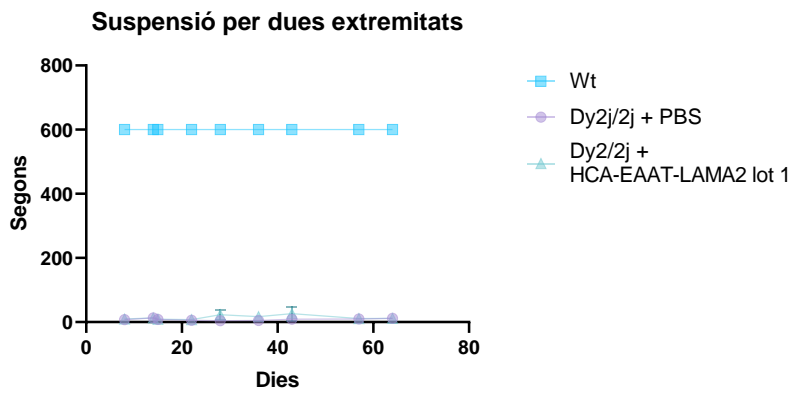
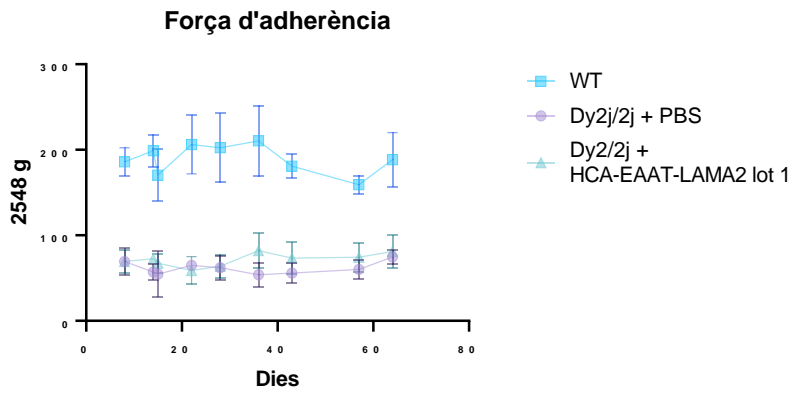


Figura 2.17. Test funcionals d'animals tractats amb HCA-EAAT-LAMA2 lot 1.

5. Discussió

Capítol 1

Plataforma in vitro de mioblastes primaris

El múscul esquelètic es el teixit més abundant del cos humà, en individus adults representa aproximadament la meitat de la massa corporal, però pot estar compromès funcionalment a causa de malalties genètiques metabòliques i neuromusculars. La capacitat de generar equivalents fisiològics *in vitro* del múscul esquelètic humà ofereix una plataforma molt valuosa i indispensable per estudis biològics fonamentals, desenvolupament de noves teràpies gèniques i farmacològiques per als trastorns musculars.

La diferenciació de mioblastes a miofibres madurs és fonamental per l'estudi dels efectes de les patologies sobre el múscul esquelètic. Moltes de les proteïnes estructurals que afecten les distròfies musculars, com és el cas de la distrofina, no s'expressen en mioblastes en cultiu i només s'expressen quan aquests es troben diferenciats a miofibres (Dumont *et al.*, 2016).

El múscul esquelètic és un teixit altament organitzat format per miofibres multinucleades alineades. Aquesta arquitectura complexa s'intenta mimetitzar *in vitro* per obtenir models que representin amb precisió les característiques bàsiques del teixit muscular esquelètic. Les miofibres multinucleades es formen per fusió i diferenciació de cèl·lules precursoras musculars; per tant, les estratègies de diferenciació haurien de proporcionar ajuda per l'organització i alineació de mioblasts permeten així la seva fusió. Estudis anteriors han demostrat que les cèl·lules amb tendència a alinear-se *in vivo* (per exemple, fibroblasts, mioblasts murins i cèl·lules endotelials) poden allargar-se i alinear-se *in vitro* si estan geomètricament confinades (Aubin *et al.*, 2011). Fins ara, les tècniques més comunes per aconseguir aquesta alineació i organització són el *micropatterning*, microemmotllament o la bioimpresió 3D (Fernández-costa *et al.*, 2021).

La majoria dels estudis publicats s'han centrat en mioblastes de roenters, i la major part de la investigació s'ha dut a terme amb la línia de mioblastes murins immortalitzats C2C12. Aquestes cèl·lules, a diferència de les mioblàstiques humanes; tenen unes condicions de cultiu de diferenciació ben definides, no requereixen de superfícies recobertes de proteïnes i es diferencien bé en una varietat de medis de diferenciació suplementats amb sèrum equí. Se sap molt menys sobre les condicions clau de diferenciació en mioblasts humans primaris i com les condicions dels cultius afecten a la seva diferenciació. Fins ara, la diferenciació de mioblastes primaris humans era una tècnica que requeria molt de temps i l'ús d'equips, medis i reactius molt costosos.

Els mioblastes murins tenen capacitat de diferenciar-se només mitjançant la deprivació de sèrum d'una manera eficaç. La disminució del contingut de sèrum en el medi de creixement es suficient per provocar una aturada de la proliferació dels mioblastes i un canvi en la fusió de mioblastes i formació de miofibres. Les condicions d'obtenció i diferenciació d'aquests cultius estan ben definits a la literatura, cosa que va afavorir els resultats positius en posar a punt aquesta tècnica al laboratori. Vam tenir resultats exitosos utilitzant el protocol establert per Springer *et al.* per l'obtenció de mioblastes de ratolí i es va obtenir una alta purificació amb el mètode pre-plating modificat descrit per Lavasani *et al.* A més veiem que com anteriorment s'ha esmentat, utilitzant un mètode de deprivació de sèrum es va observar una alta taxa de diferenciació en els cultius cel·lulars.

En canvi, s'han realitzat pocs estudis en mioblasts humans primaris no immortalitzats i encara hi ha dificultat per trobar mètodes de diferenciació cost/efectius. Les condicions d'aïllament i proliferació per les cèl·lules musculars humanes estan ben caracteritzades (Askabas and G. Gallez-Hawkins, 1985) i és una tècnica que es realitza al laboratori de Neurologia Pediàtrica de forma rutinària. Un cop obtingudes les cèl·lules mononucleades que deriven dels explants de biòpsia muscular, obtenim una població heterogènia de cèl·lules miogèniques i no miogèniques. Per tal de poder aïllar les cèl·lules miogèniques es important realitzar un pas de purificació.

Existeixen sistemes de purificació amb perles magnètiques anomenades MACS[®] que seleccionen el mioblastes CD56+ (Park, Baek and Kim, 2012) amb els que s'obtenen graus de purificació molt elevats. Per nosaltres però, era important avaluar i posar a punt una eina que permetés obtenir un percentatge de mioblastes elevat i que no eliminés del tot els fibroblasts del cultiu. Diferents estudis han demostrat que s'obté un major grau de diferenciació de cèl·lules musculars i maduració de miotubs quan les cèl·lules C2C12 es co-cultiven amb fibroblasts (Cooper *et al.*, 2004; Mathew *et al.*, 2011). És important però, que el percentatge de fibroblasts es mantingui en el temps, ja que, al tenir una taxa de creixement més elevada que els mioblastes, poden ser el tipus cel·lular predominant en el cultiu si no es té en compte.

La tècnica de *pre-plating* utilitzada en aquest treball es basa en les característiques diferencials d'adhesió entre els diferents tipus cel·lulars (Rando and Blau, 1994) presents en el cultiu i és una tècnica ràpida i cost/efectiva. Es van realitzar diferents aproximacions avaluant diferents condicions i es va concloure que la tècnica de *pre-plating* amb la major proporció de cèl·lules mioblàstiques va ser quan es realitzava abans de la congelació de les cèl·lules i utilitzant *coating* de gelatina. En aquestes condicions s'obtenien fins un 80% de cèl·lules miogèniques respecte el nombre total de cèl·lules en cultiu.

En aquest treball es van provar les condicions que milloraven la diferenciació de mioblasts primaris humans per formar miofibres. L'ús del mètode clàssic de diferenciació per privació de sèrum utilitzant matrigel i amb DMEM high, 10 µg/ml de insulina i 10 µg/ml d'Apotransferrina va obtenir millors resultats dels medis testats, però tot i així va donar lloc a baix percentatge de diferenciació i s'observava orientació aleatòria dels miotubs formats. Al reduir la concentració sèrica, el que s'intenta és aturar la proliferació cel·lular, i afavorir la diferenciació. En els mioblastes de ratolí veurem que amb aquest únic pas és suficient per aconseguir un alt percentatge de diferenciació en cultiu. En canvi, en cultius de cèl·lules mioblàstiques primàries humanes hem vist que és insuficient per induir la seva diferenciació.

En canvi, es va demostrar que mitjançant modificacions de la tècnica HDSS era possible utilitzar-la amb mioblastes primaris humans i es va obtenir un índex de fusió superior al 80%, amb una alta organització i orientació de les fibres diferenciades. Així, l'índex de fusió en mioblastes primaris humans sense patologies neuromusculars amb la tècnica HDSS va ser un 65% més alt que amb la tècnica de privació de sèrum amb una diferencia altament significativa.

A continuació es va testar si amb la tècnica modificada HDSS també s'obtenia una alta diferenciació de cultius primaris humans en pacients amb DMD. Es van avaluar cultius primaris de tres pacients; en dos d'ells es va obtenir un índex de fusió superiors al 70%, amb una alta organització i orientació mentre que en el tercer es va obtenir un índex de fusió inferior al 10%. Això ens indica la importància de mantenir les condicions de cultiu al obtenir cèl·lules primàries a partir d'explants de biòpsia muscular i de la necessitat de testar la capacitat de diferenciació dels cultius primaris abans de realitzar qualsevol altre tècnica. Si es canvien les condicions de

cultiu al obtenir mioblastes primaris humans conscient o inconscientment és possible que aquest perdi la seva capacitat de diferenciació.

Els mioblastes han d'estar propers en l'espai per reconèixer-se i fusionar-se en miotubs de forma eficient. Treballar amb una alta densitat cel·lular va ser clau per obtenir miotubs multinucleats. Els cultius cel·lulars de baixa densitat afavoreixen que les cèl·lules s'aplanin en la placa de cultiu. La proliferació d'aquest tipus cel·lular es afavorit en presència de factors de creixement que es troben en el medi de cultiu de creixement. En canvi, en la tècnica HDSS, la generació d'una taca d'alta densitat cel·lular provoca que hi hagi dos tipus d'ambient dintre d'aquesta taca: (1) les cèl·lules del centre que tindran molt poc espai per créixer i per tant el contacte cèl·lula – cèl·lula alentirà el creixement i induirà l'expressió de gens de diferenciació, augmentant la capacitat de fusionar-se i expressar proteïnes contràctils. (2) Les cèl·lules de la perifèria, que al tenir menor densitat cel·lular al costat perifèric tindran capacitat proliferativa però es veuran obligades a competir per l'espai, que serà menor a mesura que passa el temps i per tant es veuran obligades a alinear-se. Un cop alineades quan augmenti el contacte cèl·lula-cèl·lula passaran a ser el tipus cel·lular descrit anteriorment, i per tant començarà la seva fusió d'una manera alineada i organitzada.

En general, la tècnica HDSS modificada aquí descrita representa una millora objectiva respecte els models de cultiu cel·lular humà convencionals, resultant en una eina robusta i d'alt rendiment amb un cost econòmic relativament baix i que es pot realitzar amb materials disponibles a qualsevol laboratori. Resultant en una eina útil per fer servir com a plataforma *in vitro* per estudis preclínic, no només en DMD, sinó també potencialment per altres tipus de Distrofies Musculars.

Acció de fàrmacs read-through

El present estudi representa un anàlisi de la capacitat dels fàrmacs *read-through* de restablir l'expressió de distrofina *in vitro* en mioblastes provinents de ratolí i de pacients amb diferents mutacions *nonsense*.

Els aminoglicòsids són antibiòtics que presenten activitat *read-through* de forma natural però tenen una elevada toxicitat. És per això que es van realitzar cribratges massius amb la finalitat de cercar fàrmacs amb la mateixa capacitat sense els efectes tòxics. PTC124, RTC13 i RTC14 són fàrmacs amb aquesta capacitat, que han sigut testats en model de ratolí mdx i s'ha descrit capacitat restaurativa de la distrofina (Welch *et al.*, 2007; Kayali *et al.*, 2012).

L'efectivitat de PTC124 ha estat motiu de gran controvèrsia des dels seus inicis. Mentre que hi ha publicacions independents que recolzen la seva efectivitat mostrant resultat positius en models cel·lulars i animals (Bezzetti *et al.*, no date; Li *et al.*, no date; Sarkar, Zhang and Mukherjee, 2012; Gómez-grau *et al.*, 2015) altres treballs qüestionen l'activitat d'aquest fàrmac i alguns autors han atribuït la seva activitat a un efecte no relacionat amb la restauració traduccional de la mutació *nonsense*, sino a efectes directes sobre el gen de la luciferasa utilitzat en els estudis en el desenvolupament d'aquesta molècula (Auld *et al.*, 2009; Harmer *et al.*, 2012; McElroy *et al.*, 2013; Bolze *et al.*, 2017).

Els anàlisis d'eficàcia del tractament realitzats en context d'un assaig clínic en pacients amb DMD (NCT01826487) es va fer mitjançant la prova de la marxa de 6 minuts i, segons els resultats

obtinguts, el tractament a dosis baixes demostrava una millora en un subgrup de pacients. L'anàlisi dels resultats ha posat de manifest una alta variabilitat de resposta.

És en aquest context de resultats contradictors obtinguts tant en experiments *in vitro*, com *in vivo* i on el mecanisme d'acció encara no està ben establert on es va voler verificar en primer lloc si podíem observar en una plataforma *in vitro* de mioblastes de ratolí mdx restauració de distrofina. I també, si en una plataforma *in vitro* de mioblasts humans primaris on es testarien diferents mutacions es podia observar restauració en l'expressió de distrofina i poder conèixer si les causes de variabilitat en la seva eficàcia podrien ser degudes a l'heterogenitat en les mutacions *nonsense* dels pacients.

Al testar aquest fàrmac *read-through* en mioblastes primaris derivats de ratolins mdx no hem pogut visualitzar la restauració de distrofina mitjançant Western blot. Quan es van testar aquest fàrmac en mioblastes primaris humans diferenciats amb la tècnica HDSS es va observar un efecte citotòxic sobre aquestes cèl·lules, arribant a produir una mortalitat en el 100% de les cèl·lules a les 48 hores de tractament.

Després de la realització del estudis anteriorment descrits es va publicar que la resposta a les discrepàncies trobades podia explicar-se per diferències en l'activitat *read-through* depenents del tipus de codó d'aturada. En el cas de ratolí mdx la mutació natural és c.3185C>T i p.Gln993* i el codó present en la soca wt CAA, codó pel qual s'ha descrit que el PTC124 té menys activitat.

A més, cal tenir en compte la sensibilitat de la tècnica utilitzada per determinar la presència de distrofina. En aquesta cas es va utilitzar Western blot, és possible que no sigui una tècnica el suficientment sensible per detectar nivells baixos de distrofina. Hem de tenir en compte que la quantitat mínima de distrofina que es requereix per arribar a una estabilitat muscular funcional normal es troba entre el 29% i el 57% (Neri *et al.*, 2007), nivells que sí serien detectats per aquesta tècnica.

Capítol 2

Expressió de L211rh en múscul de ratolins tractats per via sistèmica

Tot i l'alta massa molecular de la L111 natural derivada del sarcoma murí Engleberth-Holm-Swam (EHS), Rooney *et al.* (Jachinta Rooney and Gurple, 2009; Jachinta E Rooney *et al.*, 2012) van demostrar que això no era una barrera per al seu lliurament després de l'administració intraperitoneal, doncs era detectable als músculs esquelètics i al cor dels ratolins mdx i Dy^{2j/2j}.

Tot i que la L111 de ratolí i humana tenen un alta homologia, al igual que entre la L111 i la L211, hi ha aproximadament un 30% de diferències en la seqüència primària d'aminoàcids, a més de diferències en el patró de glicosilació.

Per testar si la laminina-211 humana també es pot lliurar sistèmicament al múscul de ratolins Dy^{2j/2j}, es van tractar aquests ratolins amb una dosi única de L211rh per via intraperitoneal (i.p.). Es van sacrificar als 7 i 14 dies després de l'administració i es van testar les crioseccions de gastrocnemis per la presència de proteïna L211 utilitzant immunofluorescència contra laminina α -2 humana i FLAG. La immunohistoquímica va ser positiva per als dos marcatges mostrant un patró típic de matriu extracel·lular, el que demostrava que l'administració per via sistèmica de la proteïna recombinant humana L211 es possible en ratolins deficients per laminina.

Posteriorment a la realització d'aquests experiments, Barraza-Flores *et al.* (Barraza-Flores *et al.*, 2020) van obtenir resultats similars als aconseguits en el nostre grup, mostrant que tant mitjançant l'administració sistèmica setmanalment de L111 i L211 humana en ratolins NODScid^{dy} obtenien millora de la funció i la patologia molecular.

Aquestes troballes obren el camí a noves teràpies substitutives per a MDC1A basades en l'administració de proteïna recombinant. A més, aquests resultats també permeten hipotetitzar que si hi hagués un òrgan que sintetitzés la proteïna i la secretés al sistema circulatori, aquesta podria arribar al seu òrgan diana i unir-se al seus lligands.

Expressió de laminines en línies cel·lulars i teixits

L'expressió d'expressió de les cadenes $\beta 1$ i $\gamma 1$ ha estat explorada àmpliament en diferents estudis (The Human Protein Atlas, 2022) però encara no quedà completament clara el patró d'expressió d'aquestes laminines en fetge. Al analitzar la informació disponible a *Human Protein Atlas*, una de les principals bases de dades d'expressió en humans, podem veure com hi han discrepàncies en l'expressió d'algunes subunitats de laminina entre les diferents mostres hepàtiques.

Per tal de poder avaluar la viabilitat de que el fetge sigui un bon òrgan diana per la producció de L211 al introduir un vector d'expressió per la cadena laminina- $\alpha 2$, es va estudiar el patró d'expressió de les cadenes implicades de laminines en diferents línies hepàtiques, hepatòcits primaris i organoides de fetge.

Es van estudiar les línies cel·lulars HepG2 i AML12 mitjançant RT-qPCR. En les dues línies cel·lulars es va detectar expressió basal de les cadenes $\beta 1$ i $\gamma 1$. No obstant això, els nivells d'expressió a les AML12 era molt baix, cosa que podria ser un factor limitant en la trimerització de la L211 en aquestes cèl·lules.

Seguidament, es van comparar els nivells d'expressió de les diferents subunitats de laminines en hepatòcits primaris aïllats amb els obtinguts en les diferents línies cel·lulars i es van obtenir resultats discrepants. La cadena $\gamma 1$ es va trobar expressada tant en hepatòcits humans com de ratolí i organoides humans. En canvi, la cadena $\beta 1$ només es va trobar expressada per els organoides humans, però no en hepatòcits primaris.

Aquestes diferències poden ser degudes a diferents motius que seran exposats a continuació. Un d'ells és l'alteració d'aquests hepatòcits aïllats després de la interrupció dels contactes cèl·lula – cèl·lula i cèl·lula – matriu durant el procés d'aïllament. S'ha vist que si les cèl·lules no estan ancorades i cultivades en condicions adequades (laminines, col·lagen IV, perlecà, etc.) es pot provocar disfunció cel·lular i conseqüentment apoptosi, que provocarà una alteració en l'expressió gènica, com en aquest cas podria ser per la LAMB1 (Watanabe *et al.*, 2016). Una altra possibilitat que explicaria la diferència d'expressió és l'alta variabilitat intra i interindividual. La variabilitat intraindividual es pot observar fàcilment al realitzar una immunohistoquímica en teixit hepàtic. En un mateix lòbul hepàtic hi ha zones amb major presència de laminina- $\beta 1$ i laminina- $\gamma 1$, tant intracel·lular com extracel·lular (The Human Protein Atlas, 2022) Aquest fenomen s'anomena zonació hepàtica, i consisteix en la distribució no uniforme de les funcions hepàtiques al llarg de l'eix radial del lòbul en funció del microambient que envolta els hepatòcits. Aquest microambient es veu alterat principalment per la proximitat al torrent sanguini, on la pressió parcial d'oxigen i altres molècules són més abundants. Així doncs, de la mateixa manera

que altres vies es veuen alterades per aquesta zonació, l'expressió de proteïnes com les laminines també es podria distribuir de manera no homogènia en les diferents zones hepàtiques (Manco and Itzkovitz, 2021). A més, hi ha variabilitat interindividual, però encara no està clar quins factors influeixen en aquesta variabilitat, tot i que sembla està relacionada amb l'edat i el gènere. Es van analitzar sis individus diferents amb un diagnòstic diferent que va requerir una resecció hepàtica. Aquests individus van mostrar diferents patrons en l'expressió de les cadenes de laminina, principalment en la laminina- β 1 (Watanabe *et al.*, 2016). S'ha descrit que els pacients amb MDC1A tenen una regulació a l'alça d'altres subunitats de laminines, com la laminina- α 4, com a mecanisme compensatori a la manca de laminina- α 2 (Yurchenco *et al.*, 2018). Aquest fet indica que aquests gens estan regulats o poden ser induïts en funció de les necessitats, sent menys expressats en situacions de poca demanda. De manera que el moment en el que es realitza la presa de la mostra analitzada podria ser un altre factor que afavoreixi la variabilitat. Així doncs, per tots els motius exposats anteriorment, es pot suposar que l'expressió de laminina- β 1 és molt variable, i aquesta pot ser la raó per la qual no es va observar en les mostres d'hepatòcits aïllats en aquest estudi.

Expressió de pD23-EAAT-LAMA2 i pD23-EAAT-LAMA2-H *in vitro*

Un cop confirmat que les nostres línies cel·lulars hepàtiques tenen expressió de LAMB1 i LAMC1, les vam transfectar amb dos plasmidis que contenen el cDNA de la LAMA2 humana amb i sense cua d'histidines.

Es van detectar nivells d'expressió del transgen (mRNA) significativament elevats en comparació amb controls sense transfectar pels dos plasmidis testats, tant en les línies cel·lulars humanes com en les murines. Indicant així la funcionalitat del promotor i la transcripció adequada del constructe 48 hores post transfecció.

A nivell proteic, vam considerar que la proteïna necessitava períodes de temps més llargs, donat que és una proteïna considerablement llarga. En altres estudis, s'havia vist que per la producció de laminines similars, com es el cas de la L521 en HEK293T es necessitàvem 5 dies per observar el pic de producció (Tryggvason, 2012).

Tanmateix, quan vam analitzar la producció de proteïnes després de 4 i 6 dies no es va detectar laminina- α 2 de manera intracel·lular ni extracel·lularment. Però sí que vam ser capaços de detectar una banda de ~60 kDa a la fracció intracel·lular que es veu diferencialment expressada en les cèl·lules transfectades, poden ser aquesta doncs específica de L211. Una possible raó de la manca de detecció laminina- α 2 podria ser la dilució de l'expressió plasmídica, ja que la proporció de cèl·lules transfectades és menor cada vegada que les cèl·lules es divideixen. Un altre motiu possible és que després de 6 dies en el mateix matràs amb només una renovació del medi el dia 2, la supervivència cel·lular i el perfil d'expressió podria veure's afectat. Hem intentat reduir la concentració sèrica al medi per tal de frenar el creixement cel·lular i tenir una proporció més gran de laminina- α 2 al medi, utilitzant concentracions del 0%, 2% i 5%. No obstant això, la taxa de creixement no es va veure influenciada per això i la supervivència cel·lular era menor quan es reduïa el sèrum.

Pel que fa a la proteïna que va ser seleccionada amb la columna Histag, no vam ser capaços de detectar-la ni mitjançant l'anticòs específic per LAMA2 i tampoc el específic per HisTag. Això pot ser degut a que la proteïna no fos seleccionada per aquesta columna degut a que es requereix

de ajustar els buffers d'elució o també podria ser degut a un mal plegament de la proteïna en el que amaga l'epítop on es troba la cua d'histidines.

Tots aquests fets dificulten la detecció de laminina- $\alpha 2$ *in vitro* per Western blot, especialment en línies cel·lulars amb alta producció de proteïnes, com les línies cel·lulars del fetge. A més, el fet que la seva proporció de divisió sigui relativament alta, fa que no sigui possible incubar les cèl·lules durant períodes de temps més llargs si la proteïna necessita més de 6 dies per produir-se o secretar-se.

Expressió de pD23-EAAT-LAMA2 i pD23-EAAT-LAMA2-H *in vitro*

Per avaluar la funcionalitat del promotor i la correcta transcripció dels plasmidis codificant per la laminina- $\alpha 2$ *in vivo* es van realitzar injeccions hidrodinàmiques en ratolins wt y $Dy^{2j/2j}$.

En els dos casos es van detectar nivells d'expressió de mRNA molt baixos i no significativament diferents dels trobats en els controls no injectats. A més, no vam ser capaços de detectar la proteïna al múscul d'aquests ratolins tractats.

La tècnica d'injecció hidrodinàmica es una tècnica de lliurament de DNA nu mitjançant la injecció ràpida (5-7 segons) d'ADN plasmídic en un volum equivalent al 8-10% del pes corporal del ratolí. En teoria es pot aconseguir fins a un 30-40% d'eficiència de transfecció al fetge. Tanmateix, es conegut que la grandària d'aquest DNA plasmídic afecta l'eficiència de transfecció (Bonamassa, Hai and Liu, 2011). El nostre plasmidi es d'una mida gran, cosa que podria explicar la baixa l'eficiència de transfecció que hem trobat a nivell d'mRNA i, conseqüentment, la baixa producció de proteïna, cosa que fa que sigui indetectable a nivell muscular.

Tot i no utilitzar cap plasmidi amb gen reporter com a control en aquest estudi, estem convençuts que la tècnica utilitzada es correcta degut a que mitjançant una col·laboració vam realitzar aquesta mateixa tècnica en animals $Dy^{2j/2j}$ de la mateixa colònia amb un plasmidi que contenia luciferasa i posteriorment es va veure que hi havia expressió a fetge (Pallarès-masmitjà *et al.*, 2021).

Expressió de laminina- $\alpha 2$ en cèl·lules HepG2 tractades amb HC-Adv5 amb LAMA2 humana

Un cop analitzada la correcta expressió dels plasmidis codificant per la laminina- $\alpha 2$ es va procedir a la producció dels vectors virals Adv5 amb aquests constructes testats. L'obtenció i producció de les partícules adenovirals s'ha realitzat en el laboratori del Dr. Rubén Hernández i Manuela González del grup de Teràpia gènica i Regulació de l'expressió gènica del CIMA / Universitat de Navarra.

Un cop realitzada la producció es va realitzar una quantificació de número de còpies genòmiques (*genome copies* o *gc*). Vam observar que en el lot 1 de HCA-EAAT-LAMA2 es trobava un número de còpies molt més baix que en la resta de lots. En canvi, els lots 2 de HCA-EAAT-LAMA2 i el 1 de HCA-EAAT-LAMA2-H tenien un títol molt més alt. Els diferents lots es van produir a temps diferents, donant així variabilitat en la seva producció i per tant variabilitat en la quantificació de transgen.

Per tal de testar la funcionalitat del promotor i la seva correcta expressió, es va transduir la línia HepG2. Es va escollir aquesta línia degut a que el grup que va produir el vector havia demostrat anteriorment que el promotor EalbAAT, utilitzat en aquestes constructes, té una millor expressió en l'esmentada línia cel·lular.

A nivell de mRNA, vam trobar nivells d'expressió significativament més alts en les cèl·lules transduïdes a totes les MOI utilitzades pels lots 2 del vector HCA-EAAT-LAMA2 i el lot 1 del HCA-EAAT-LAMA2-H. En canvi, pel lot 1 del HCA-EAAT-LAMA2 es van trobar nivells d'expressió pràcticament imperceptibles. Aquests resultats són consistents amb la quantificació realitzada anteriorment i permeten concloure que es necessita un títol més alt que els dels lots 2 de HCA-EAAT-LAMA2 i el 1 de HCA-EAAT-LAMA2-H per tal d'aconseguir una expressió detectable del transgen.

Tot i no testar els vectors en línies cel·lulars hepàtiques murines, en anteriors estudis es va demostrar que la LAMA2 humana en el model de ratolí $Dy^{2j/2j}$ es capaç de restaurar la síntesi i localització de laminina- $\alpha 2$ al múscul esquelètic, millorant també la morfologia i funcionalitat muscular i la longevitat del ratolí. Es va realitzar un model de ratolí transgènic que expressava LAMA2 humà sota la regulació d'un promotor de creatina cinasa específica del múscul (Kuang *et al.*, 1998). Es per això que no creiem que, tot i no testar aquest vector en ratolí, hi hagin d'haver grans diferències en els resultats obtinguts amb la línia cel·lular hepàtica humana.

Expressió de laminina – $\alpha 2$ en ratolí tractats amb HC-Adv5 amb LAMA2 humà

Al tractar els ratolins amb el vector HC-Adv5 contenint el LAMA2 humà, vam trobar expressió significativa d'ARNm al fetge dels ratolins tractats amb 100 μ l dels vectors HCA-EAAT-LAMA2 lot 2 i HCA-EAAT-LAMA2-H lot 1. Aquesta expressió es va veure en tots els temps analitzats entre 7 i 21 dies després de la seva administració. Aquest fet ens corrobora que el vector es capaç d'arribar als hepatòcits dels ratolins i expressar-se.

En el cas del vector HCA-EAAT-LAMA2 lot 1, no es troben nivells d'ARNm significativament augmentats, fet que es correlaciona amb el baix número de còpies de transgen detectat en la titulació del vector.

Tanmateix, la detecció de la proteïna a nivell hepàtic no queda del tot clara. Al realitzar Western blot dels ratolins tractats no es va observar banda positiva de laminina- $\alpha 2$ de la mida esperada. Es va utilitzar com a control positiu la proteïna L211 humana recombinant (BioLamina) la qual mostra una banda positiva a laminina- $\alpha 2$ a 280 KDa amb l'anticòs utilitzat. En canvi, en els animals tractats, l'anticòs contra laminina- $\alpha 2$ humana detectava una banda de ~ 60 KDa que era més intensa en els animals traçats, però que també estava present en les mostres dels ratolins no tractats.

Per tal de poder dilucidar si en aquesta banda més petita estàvem detectar LAMA2 humana, vam enviar una selecció de mostres de bandes electroforètiques per analitzar per espectrofotometria de masses. En els controls no tractats no es va trobar cap coincidència amb la proteïna LAMA2 humana, en canvi, en 1 dels dos ratolins tractats testats es va trobar un pèptid que corresponia amb la seqüència específica de la proteïna humana.

De manera que podem concloure que la banda de ~ 60 kDa està relacionada amb la síntesi de laminina- $\alpha 2$ humana, i que s'ha detectat als 21 dies al fetge d'un dels ratolins tractats.

Actualment s'han processat la resta de mostres i s'han enviat a analitzar per espectrofotometria de masses.

La detecció d'un únic pèptid, ens indica que els nivells de proteïna produïts són probablement molt baixos. El fet d'obtenir nivells d'expressió d'RNAm elevats però nivells de proteïna tan baixos, ens fa pensar que hi ha un embut en la producció de la proteïna a nivell hepàtic. Això podria ser pel fet que tot i expressar LAMB1 i LAMC1, com hem vist anteriorment, LAMC1 pot tenir una expressió variable o subòptima. Si alguna de les dues cadenes tenen una expressió baixa, hi haurà poca trimerització de la proteïna i conseqüentment poca quantitat de proteïna final a teixit. Un altre factor limitant podria ser que tot i tenir una expressió normal d'aquestes dues cadenes, el fetge es productor d'altres laminines que necessiten aquestes dues cadenes per tal de ser trimeritzades. Això podria provocar una prioritització de les altes proteïnes de producció natural en aquest òrgan, però es pensa que degut a la utilització d'un promotor tant potent com es el EalbAAT això deuria ser una avantatge i evitar que es provoqui aquesta prioritització negativa per nosaltres. Altres explicacions alternatives podrien ser una deficient traducció de l'RNAm de LAMA2, un processament intracel·lular subòptim, o que l'epítot reconegut pels anticossos utilitzats es perdi per una conformació incorrecta de la proteïna o per que la trimerització amb les altres dos subunitats murines ($\beta 1$ i $\gamma 1$) alteri d'alguna manera la subunitat humana ($\alpha 2$), de forma que no necessàriament hagi de perdre la seva funcionalitat, però si l'epítot conformacional.

Pel que fa a la detecció de LAMA2 humana a nivell muscular, no vam ser capaços de detectar-la ni mitjançant immunohistoquímica ni per Western blot. Atesa la baixa concentració de proteïna detectada a fetge, aquests resultats son concordants. Creiem que seria necessari assolir una major concentració de proteïna a fetge, per tal de que aquesta pogués ser secretada i transportada fins al múscul i emmagatzemada en aquest unint-se al seus receptors de manera que la seva acumulació progressiva facilités la seva detecció.

També s'ha de tenir en compte el factor temps, es possible que degut a que és tracta d'una proteïna tan gran, la seva producció i acumulació en els teixits estudiats necessiti més temps per que siguem capaços de visualitzar-la.

Alhora, es necessari substituir les laminines ja existents a múscul que podrien estar substituïnt a la L211, com s'observa amb la L411 o L511 (Jachinta E Rooney *et al.*, 2012; Yurchenco *et al.*, 2018). Aquest fet el podríem accelerar administrant CTX després de l'administració del vector, afavorint la regeneració aguda del múscul i per tant la renovació proteica. Caldria saber però, en quin moment es produeix el pic de producció de proteïna en fetge per tal de poder induir la renovació quan s'hagi acumulat la suficient proteïna a fetge.

Un altre possible explicació per no observar o observar una poca quantitat de proteïna es que L211 fos secretada en la seva gran majoria pel fetge, no acumulant-se intracel·lularment i per tant trient la possibilitat de detectar-la mitjançant Western Blot en el teixit. Tot i ser secretada, la proteïna podria no trobar-se a múscul degut a l que la inflamació/fibrosi trobat en aquest model de patologia dificulti la seva adhesió amb els seus lligants i per tant la seva acumulació.

Podem concloure que en les nostres condicions experimentals, la detecció de proteïnes al múscul probablement requereix una producció, secreció i acumulació suficient durant un període de temps suficient, probablement més llarg al que hem testat en els nostres experiments. També es probable que la producció de la proteïna estigui limitada en el fetge per la expressió d'alguna de les altres dues cadenes necessàries per trimeritzar-se la proteïna i secretar-se. Per tal de solucionar aquest problema, teòricament el vector HC-Adv5 es

suficientment gran com per poder-se incloure les altres dues cadenes que formen la L211. D'aquesta manera ens assegurariem que l'òrgan diana del vector, sigui el que sigui, produeixi totes les subunitats necessàries per la producció de la L211 i no hi hagi cap de les cadenes que sigui limitant. Creiem, però, que l'eficiència de producció d'un vector amb un transgen tan gran disminuiria significativament, sense esmentar les dificultats tècniques que ens trobaríem.

Per una altra part, també existeix la possibilitat d'utilitzar un altre òrgan com a òrgan productor de la proteïna. En aquest treball, tot i no trobar resultats molt positius en la producció eficient de L211 en fetge, si que hem reforçat la idea de que la producció ectòpica (extra-muscular) de L211 és una estratègia correctora vàlida per la teràpia gènica en MDC1A.

A l'analitzar les bases de dades d'expressió gènica GTEx i *Human Protein Atlas*, observem que tant en humà com en ratolí les cèl·lules d'origen mesenquimal, independent de la seva localització, són les que expressen nivells més alts de manera intrínseca de les diferents subunitats necessàries per la producció de L211. Aquest fet, juntament amb la capacitat de poder modificar aquest tipus cel·lular *ex vivo* i realitzar una posterior infusió en el pacient, podria representar una millora en la estratègia terapèutica que hem utilitzat en aquest treball.

6. Conclusions

Capítol 1

- La tècnica de cultiu primari de mioblastes murins que s'ha posat a punt en aquesta tesi permet obtenir, de manera específica i reproducible, un alt percentatge de diferenciació, tant a partir de teixit muscular de ratolins sense patologia com del model murí deficient en distrofina.
- La tècnica de diferenciació d'alta densitat cel·lular modificada (HDSS) per a mioblastes primaris humans permet aconseguir una elevada diferenciació cel·lular de manera cost-efectiva i reproducible, tant a partir de mioblastes primaris obtinguts de músculs sense patologia com de biòpsies obtingudes de pacients amb malalties musculars com la Distrofia Muscular de Duchenne.
- El tractament de mioblastes primaris murins amb els fàrmacs amb acció read through PTC124, RTC13 i RTC14 a les dosis i durades de tractaments avaluats en aquesta tesi no aconsegueix elevar de manera significativa els nivells de nivells de Distrofina.
- El tractament de mioblastes primaris humans diferenciats obtinguts de biòpsies de pacients amb DMD causada per mutacions sense sentit no aconsegueix canvis significatius en l'expressió de Distrofina.

Capítol 2

- L211rh administrada per via sistèmica a ratolins Dy2j/2j és capaç d'arribar a la matriu extracel·lular dels músculs gastrocnemis de les potes posteriors formant una distribució pericel·lular característica de les laminines.
- Hi ha expressió de LAMB1 i LAMC1 a les línies cel·lulars hepàtiques estudiades. LAMC1 es va expressar a hepatòcits humans aïllats i a organoides. En canvi, no es va observar expressió de LAMB1 a hepatòcits humans aïllats, però sí es va observar expressió a organoides hepàtics. Fet que ens mostra la influència de les condicions externes en la variabilitat de l'expressió de les diferents cadenes de conformen les laminines.
- Els plasmids pD23-EAAT-LAMA2 i Pd23-EAAT-LAMA2-H s'expressen correctament a nivell de mRNA en HepG2 i AML12. Es va detectar expressió de LAMA2 a nivell proteic intracel·lularment en les línies cel·lulars HepG2 als 7 dies després de la transfecció.
- No es van detectar nivells significatius de LAMA2 al administrar pD23-EAAT-LAMA2 i pD23-LAMA2-H de manera hidrodinàmica a animals wt i dy^{2j/2j}.
- Els vectors HCA-EAAT-LAMA2 lot 2 i HCA-EAAT-LAMA2-H lot 1 expressen correctament amb valors significativament positius el transgen LAMA2 a línies cel·lulars HepG2 en MOIS des de 25 fins a 250.
- Els vectors HCA-EAAT-LAMA2 lot 2 i HCA-EAAT-LAMA2-H lot 1 expressen correctament el transgen de LAMA2 a 7 i 21 dies després de la seva administració. A nivell proteic en teixit hepàtic detectem una proteïna de pes molecular més baix que la L211 recombinant positiva per l'anticòs L211 que té tendència a tenir una expressió més alta en els animals traçats als 7 i 21 dies. Es confirma per espectrofotometria de masses que aquesta banda podria correspondre a la L211. A nivell muscular però, no som capaços de detectar la proteïna per cap dels lots testats.

Bibliografia

- Aartsma-rus, A. *et al.* (2003) 'Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients', *12(8)*, pp. 907–914. doi: 10.1093/hmg/ddg100.
- Aartsma-rus, A. *et al.* (2010) 'Therapeutic exon skipping for dysferlinopathies', (January), pp. 889–894. doi: 10.1038/ejhg.2010.4.
- Aartsma-rus, A., Deutekom, J. C. T. V. A. N. and Fokkema, I. V. O. F. (2006) 'Entries in the Leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule', (August), pp. 135–144. doi: 10.1002/mus.20586.
- Aoki, Y. *et al.* (2013) 'Highly efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice.', *Human molecular genetics*, *22(24)*, pp. 4914–4928. doi: 10.1093/hmg/ddt341.
- Asakura, A., Komaki, M. and Rudnicki, M. A. (2001) 'Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation', pp. 245–253.
- Askabas, V. and G. Gallez-Hawkins (1985) 'Synergistic Influence of Polypeptide Growth allowman', *Arch Neurol*, *42*(Aug 1985), pp. 749–752.
- Aubin, H. *et al.* (2011) 'Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels', *31(27)*, pp. 6941–6951. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.056.Directed.
- Auld, D. S. *et al.* (2009) 'Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106(9)*, pp. 3585–3590. doi: 10.1073/pnas.0813345106.
- Barraza-Flores, P. *et al.* (2020) 'Human laminin-111 and laminin-211 protein therapy prevents muscle disease progression in an immunodeficient mouse model of LAMA2-CMD', *Skeletal Muscle*, *10(1)*, pp. 1–12. doi: 10.1186/s13395-020-00235-4.
- Barro, M. *et al.* (2010) 'Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *14(1–2)*, pp. 275–289. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00368.x.
- Barton-davis, E. R. *et al.* (1999) 'Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice', *104(4)*, pp. 375–381.
- Baruteau, J. *et al.* (2017) 'Gene therapy for monogenic liver diseases: clinical successes, current challenges and future prospects', *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *40(4)*, pp. 497–517. doi: 10.1007/s10545-017-0053-3.
- Bezzerra, V. *et al.* (no date) 'Ataluren-driven restoration of Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein function in'. *American J Hematol* - 2017.
- Birnkrant, P. D. J. *et al.* (2018) 'Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management', *17(3)*, pp. 251–267. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30024-3.Diagnosis.
- Blat, Y. and Blat, S. (2015) 'Drug Discovery of Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy'.
- Bolze, F. *et al.* (2017) 'Aminoglycosides, but not PTC124 (Ataluren), rescue nonsense mutations in the leptin receptor and in luciferase reporter genes', *Scientific Reports*, (January), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-017-01093-9.

- Bonomassa, B., Hai, L. and Liu, D. (2011) 'Hydrodynamic Gene Delivery and Its Applications in Pharmaceutical Research', 28(4), pp. 694–701. doi: 10.1007/s11095-010-0338-9.Hydrodynamic.
- Brunetti-Pierri, N. *et al.* (2013) 'Transgene Expression up to 7 Years in Nonhuman Primates Following Hepatic Transduction with Helper-Dependent Adenoviral Vectors', *Human Gene Therapy*, 24(8), pp. 761–765. doi: 10.1089/hum.2013.071.
- Carlson, G. and Carlson, G. (2014) 'The use of four limb hanging tests to monitor muscle strength and condition over time Official reviewer', (Id), pp. 1–11.
- Chal, J. and Pourquié, O. (2017) 'Making muscle: Skeletal myogenesis in vivo and in vitro', *Development (Cambridge)*, 144(12), pp. 2104–2122. doi: 10.1242/dev.151035.
- Cheng, C. S. *et al.* (2014) 'Conditions that promote primary human s...re and muscle differentiation in vitro'. *Am J Physiol Cell Physiol*, p. 306(4).
- Childers, M. K. *et al.* (2014) 'Gene therapy prolongs survival and restores function in murine and canine models of myotubular myopathy', *Science Translational Medicine*, 6(220). doi: 10.1126/scitranslmed.3007523.
- Chunkayeva, D. and Jaxybayeva, A. (2021) 'A review of diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy', 18(5).
- Cohen, E. *et al.* (2021) 'The 2022 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome)', *Neuromuscular Disorders*, 31(12), pp. 1313–1357. doi: 10.1016/j.nmd.2021.11.004.
- Cooper, S. T. *et al.* (2004) 'C2C12 co-culture on a fibroblast substratum enables sustained survival of contractile, highly differentiated myotubes with peripheral nuclei and adult fast myosin expression', *Cell Motility and the Cytoskeleton*. doi: 10.1002/cm.20010.
- Cornall, L. *et al.* (2015) 'Generation and Use of Cultured Human Primary Myotubes', *Muscle Biopsy*, pp. 35–64. doi: 10.5772/33534.
- Cots, D., Bosch, A. and Chillón, M. (2013a) 'Helper Dependent Adenovirus Vectors : Progress and Future Prospects', pp. 370–381.
- Cots, D., Bosch, A. and Chillón, M. (2013b) 'Helper Dependent Adenovirus Vectors: Progress and Future Prospects', *Current Gene Therapy*, 13(5), pp. 370–381. doi: 10.2174/156652321305131212125338.
- Du, L. *et al.* (2009) 'Nonaminoglycoside compounds induce readthrough of nonsense mutations', *The Journal of Experimental Medicine*, 206(10), pp. 2285–2297. doi: 10.1007/BF01329507.
- Dumont, N. A. *et al.* (2016) 'Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division', *Nature Medicine*, 21(12), pp. 1455–1463. doi: 10.1038/nm.3990.Dystrophin.
- Dunbar, C. E. *et al.* (2018) 'Gene therapy comes of age', *Science*, 359(6372). doi: 10.1126/science.aan4672.
- Durbeej, M. (2015) 'Laminin-alpha2 Chain-Deficient Congenital Muscular Dystrophy: Pathophysiology and Development of Treatment. Current topics in membranes', 76. doi: 10.1016/bs.ctm.2015.05.002.
- Elbaz, M. *et al.* (2012) 'Losartan, a therapeutic candidate in congenital muscular dystrophy_ Studies in the dy2J_dy2J Mouse'. *Ann Neurol*, pp. 699–708.

- Erb, M. *et al.* (2009) 'Omigapil ameliorates the pathology of muscle dystrophy caused by laminin- α 2 deficiency', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(3), pp. 787–795. doi: 10.1124/jpet.109.160754.
- Et, B. and Acta, B. (1953) 'Electron Microscope Studies of the Organisation of T H E', 1, pp. 387–394.
- Fechner, H. *et al.* (1999) 'Expression of Coxsackie adenovirus receptor and alpha(v)-integrin does not correlate with aconovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers', *Gene Therapy*, 6(9), pp. 1520–1535. doi: 10.1038/sj.gt.3301030.
- Fernández-costa, J. M. *et al.* (2021) 'Bioengineered in vitro skeletal muscles as new tools for muscular dystrophies preclinical studies', pp. 10–12. doi: 10.1177/2041731420981339.
- Finkel, R. S. *et al.* (2013) 'Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy', *PLoS ONE*, 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0081302.
- Gaster, M. *et al.* (2001) 'A cellular model system of differentiated human myotubes', *Apmis*, 109(11), pp. 735–744. doi: 10.1034/j.1600-0463.2001.d01-140.x.
- Gawlik, K. I. and Durbeej, M. (2011) 'Skeletal muscle laminin and MDC1A: pathogenesis and treatment strategies', *Skeletal Muscle*, 1(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/2044-5040-1-9.
- Gillies, A. R. and Lieber, R. L. (2011) 'Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix', *Muscle and Nerve*, 44(3), pp. 318–331. doi: 10.1002/mus.22094.
- Gómez-Aguado, I. *et al.* (2020) 'Nanomedicines to deliver mRNA: State of the art and future perspectives', *Nanomaterials*, 10(2). doi: 10.3390/nano10020364.
- Gómez-grau, M. *et al.* (2015) 'Evaluation of Aminoglycoside and Non- Aminoglycoside Compounds for Stop-Codon Readthrough Therapy in Four Lysosomal Storage Diseases', pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0135873.
- Gonzalez-Aparicio, Manuela *et al.* (2011) 'Oxaliplatin in combination with liver-specific expression of interleukin 12 reduces the immunosuppressive microenvironment of tumours and eradicates metastatic colorectal cancer in mice', *Gut*, 60(3), pp. 341–349. doi: 10.1136/gut.2010.211722.
- Gonzalez-Aparicio, M. *et al.* (2011) 'Self-inactivating helper virus for the production of high-capacity adenoviral vectors', *Gene Therapy*, 18(11), pp. 1025–1033. doi: 10.1038/gt.2011.58.
- Goudenege, S. *et al.* (2010) 'Laminin-111: A Potential Therapeutic Agent for Duchenne Muscular Dystrophy'. doi: 10.1038/mt.2010.165.
- Greising, S. M. *et al.* (2012) 'Systems biology of skeletal muscle: Fiber type as an organizing principle', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 4(5), pp. 457–473. doi: 10.1002/wsbm.1184.
- Guiraud, S. *et al.* (2010) 'The Pathogenesis and Therapy of Muscular Dystrophies', *BBA - Proteins and Proteomics*, 1804(9), pp. 1713–1722. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.05.001.
- Guiraud, S. *et al.* (2015) 'Advances in genetic therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy'. *Exp Physiol*.
- Guo, X. *et al.* (2011) 'Neuromuscular junction formation between human stem cell-derived motoneurons and human skeletal muscle in a defined system', *Biomaterials*, 32(36), pp. 9602–9611. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.014.

- Guo, X. *et al.* (2014) 'In vitro Differentiation of Functional Human Skeletal Myotubes in a Defined System.', *Biomaterials science*, 2(1), pp. 131–138. doi: 10.1039/C3BM60166H.
- Haas, M. *et al.* (2015) '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', *Neuromuscular Disorders*, 25(1), pp. 5–13. doi: 10.1016/j.nmd.2014.11.011.
- Hamill, K. J. *et al.* (2009) 'Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges', *Journal of Cell Science*, 122(24), pp. 4409–4417. doi: 10.1242/jcs.041095.
- Hanson, J. and Huxley H.E (1953) 'Structural Basis of the Cross-Striations in Muscle'.
- Harmer, S. C. *et al.* (2012) 'Readthrough of long-QT syndrome type 1 nonsense mutations rescues function but alters the biophysical properties of the channel', 642, pp. 635–642. doi: 10.1042/BJ20111912.
- Heilbronn, R. and Weger, S. (2010) 'Viral vectors for gene transfer: Current status of gene therapeutics', *Handbook of Experimental Pharmacology*, 197, pp. 143–170. doi: 10.1007/978-3-642-00477-3_5.
- Hindi, L. *et al.* (no date) 'Isolation, Culturing, and Differentiation of Primary Myoblasts from Skeletal Muscle of Adult Mice'. doi: 10.21769/BioProtoc.2248.
- Holmberg, J. and Durbeej, M. (2013) 'Laminin-211 in skeletal muscle function', *Cell Adhesion and Migration*, 7(1), pp. 111–121. doi: 10.4161/cam.22618.
- Jachinta Rooney, by E. and Gurpur, P. B. (2009) 'Correction for "Laminin-111 protein therapy prevents muscle disease in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy," Correction for 'A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function', *Proc Natl Acad Sci*, 19106104(10). doi: 10.1073/pnas.0811599106).
- Jacobs, F. *et al.* (2012) 'The liver as a target organ for gene therapy: State of the art, challenges, and future perspectives', *Pharmaceuticals*, 5(12), pp. 1372–1392. doi: 10.3390/ph5121372.
- Jane T.Seto, Niclas E. Bengsston, J. S. C. (2014) 'Therapy of Genetic Disorders—Novel Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy', 2(2), pp. 102–112. doi: 10.1007/s40124-014-0044-x.Therapy.
- Jones, K. J. *et al.* (2001) 'The expanding phenotype of laminin α 2 chain (merosin) abnormalities: Case series and review', *Journal of Medical Genetics*, 38(10), pp. 649–657. doi: 10.1136/jmg.38.10.649.
- Kaji, E. H. and Leiden, J. M. (2001) 'Gene and stem cell therapies', *Journal of the American Medical Association*, 285(5), pp. 545–550. doi: 10.1001/jama.285.5.545.
- Kawabata, K., Takakura, Y. and Hashida, M. (1995) 'The Fate of Plasmid DNA After Intravenous Injection in Mice: Involvement of Scavenger Receptors in Its Hepatic Uptake', *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, pp. 825–830. doi: 10.1023/A:1016248701505.
- Kayali, R. *et al.* (2012) 'Read-through compound 13 restores dystrophin expression and improves muscle function in the MDX mouse model for duchenne muscular dystrophy', *Human Molecular Genetics*, 21(18), pp. 4007–4020. doi: 10.1093/hmg/dds223.
- Kemaladewi, D. U. *et al.* (2019) 'A mutation-independent approach for muscular dystrophy via upregulation of a modifier gene', *Nature*, 572(7767), pp. 125–130. doi: 10.1038/s41586-019-

1430-x.

Kinter, J. and Sinnreich, M. (2014) 'Molecular targets to treat muscular dystrophies', *Swiss Medical Weekly*, 144(February), pp. 1–16. doi: 10.4414/smw.2014.13916.

Körner, Z. *et al.* (2014) 'Bortezomib partially improves laminin α 2 chain-deficient muscular dystrophy', *American Journal of Pathology*, 184(5), pp. 1518–1528. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.019.

Kramer, M. G. *et al.* (2003) 'In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters', *Molecular Therapy*, 7(3), pp. 375–385. doi: 10.1016/S1525-0016(02)00060-6.

Kuang, W. *et al.* (1998) 'Merosin-deficient Congenital Muscular Dystrophy Partial Genetic Correction in Two Mouse Models', *J. Clin. Invest*, 102(4), pp. 844–852. Available at: <http://www.jci.org> (Accessed: 24 May 2018).

Lavasani, M. *et al.* (2013) 'Isolation of Muscle-Derived Stem/Progenitor Cells based on adhesion characteristics to collagen-coated surfaces', *Methods Mol Biol*, 976, pp. 53–65. doi: 10.1007/978-1-62703-317-6_5.

Le, E., Winder, S. J. and Hubert, J. (2010) 'Dystrophin : More than just the sum of its parts', *BBA - Proteins and Proteomics*, 1804(9), pp. 1713–1722. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.05.001.

Li, K.-C. *et al.* (2013) 'Submicron-grooved culture surface extends myotube length by forming parallel and elongated motif', *Micro & Nano Letters*, 8(8), pp. 440–444. doi: 10.1049/mnl.2013.0153.

Li, M. *et al.* (no date) 'Muscle dysfunction and structural defects of dystrophin-null sapje mutant zebrafish larvae are rescued by ataluren treatment', pp. 1593–1599. doi: 10.1096/fj.13-240044.

Lieber, R. (2011) *Skeletal muscle structure, function, and plasticity*.

Luca, A. De (2008) 'Use of grip strength meter to assess the limb strength of mdx mice', *TREAT-NMD Neuromuscular Network*, DMD_M.2.2.(2.0), pp. 1–11.

Manco, R. and Itzkovitz, S. (2021) 'Liver zonation Hepatocyte zonation Zonation in disease', *Journal of Hepatology*, 74(2), pp. 466–468. doi: 10.1016/j.jhep.2020.09.003.

Marquette, M. L. and Sognier, M. A. (2016) 'High- density spot seeding for tissue model formation - United States Patent', 1(12). doi: 10.1074/JBC.274.42.30033.(51).

Mathew, S. J. *et al.* (2011) 'Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis', *Development*, 138(2), pp. 371–384. doi: 10.1242/dev.057463.

McElroy, S. P. *et al.* (2013) 'A Lack of Premature Termination Codon Read-Through Efficacy of PTC124 (Ataluren) in a Diverse Array of Reporter Assays', *PLoS Biology*, 11(6). doi: 10.1371/journal.pbio.1001593.

Mcmahon, T., Zijl, P. C. M. Van and Gilad, A. A. (2015) 'Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression', 27(3), pp. 320–331. doi: 10.1002/nbm.3066.Non-invasive.

Meinen, S. *et al.* (no date) 'Apoptosis inhibitors and mini-agrin have additive benefits in congenital muscular dystrophy mice'. doi: 10.1002/emmm.201100151.

Mendell, J. R. *et al.* (2013) 'Gene Therapy for Muscular Dystrophy: Lessons Learned and Path Forward', 527(2), pp. 90–99. doi: 10.1016/j.neulet.2012.04.078.Gene.

Mercuri, E., Bönnemann, C. G. and Muntoni, F. (2019) 'Muscular dystrophies', *The Lancet*,

394(10213), pp. 2025–2038. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32910-1.

Mingozzi, F. *et al.* (2007) 'Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver', *Nature*.

Models, S. M. (2013) 'Improved Cell Culture Method for Growing Contracting This method has great potential for biomedical research and medical treatment . Hand-Based Biometric Analysis The Next Generation of Cold Immersion Dry Suit Design', (March), pp. 23–24.

Moreno, S. G. (2018) 'Depleting macrophages in vivo with clodronate-liposomes', *Methods in Molecular Biology*, 1784, pp. 259–262. doi: 10.1007/978-1-4939-7837-3_23.

Muntoni, F. *et al.* (2022) 'Real-world and natural history data for drug evaluation in Duchenne muscular dystrophy: suitability of the North Star Ambulatory Assessment for comparisons with external controls', *Neuromuscular Disorders*, 32(4), pp. 271–283. doi: 10.1016/j.nmd.2022.02.009.

Naom, I. *et al.* (1997) 'The role of immunocytochemistry and linkage analysis in the prenatal diagnosis of merosin-deficient congenital muscular dystrophy', *Human Genetics*, 99(4), pp. 535–540. doi: 10.1007/s004390050402.

Neri, M. *et al.* (2007) 'Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human', *Neuromuscular Disorders*, 17(11–12), pp. 913–918. doi: 10.1016/j.nmd.2007.07.005.

Nesmith, A. P. *et al.* (2016) 'A human in vitro model of Duchenne muscular dystrophy muscle formation and contractility', *Journal of Cell Biology*, 215(1), pp. 1–10. doi: 10.1083/jcb.201603111.

Ostrovidov, S. *et al.* (2014) 'Three-dimensional co-culture of C2C12 / PC12 cells improves skeletal muscle tissue formation and function'. doi: 10.1002/term.

Pallarès-masmitjà, M. *et al.* (2021) 'Find and cut-and-transfer (FiCAT) mammalian genome engineering', *Nature Communications*, (2021), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41467-021-27183-x.

Park, Y. G., Baek, A. and Kim, S. (2012) *Myoblast Purifying by Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS)*, *Methods in Cell Biology*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-405914-6.00025-1.

Pasteuning-Vuhman, S. *et al.* (2018) 'Natural disease history of the dy 2J mouse model of laminin $\alpha 2$ (merosin)-deficient congenital muscular dystrophy'. doi: 10.1371/journal.pone.0197388.

Pastore, N. *et al.* (2013) 'Improved efficacy and reduced toxicity by ultrasound-guided intrahepatic injections of helper-dependent adenoviral vector in gunn rats', *Human Gene Therapy Methods*, 24(5), pp. 321–327. doi: 10.1089/hgtb.2013.108.

Piccolo, P. and Brunetti-Pierri, N. (2014) 'Challenges and prospects for helper-dependent adenoviral vector-mediated gene therapy', *Biomedicines*, 2(2), pp. 132–148. doi: 10.3390/biomedicines2020132.

Qiao, C. *et al.* (2018) 'Amelioration of Muscle and Nerve Pathology in LAMA2 Muscular Dystrophy by AAV9-Mini-Agrin', *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 9(June), pp. 47–56. doi: 10.1016/j.omtm.2018.01.005.

Qiao, C. P. *et al.* (2005) 'Amelioration of laminin-alpha 2-deficient congenital muscular dystrophy by somatic gene transfer of miniagrin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), pp. 11999–12004. doi: 10.1073/pnas.0502137102.

Rando, T. A. and Blau, H. M. (1994) 'Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy', *Journal of Cell Biology*, 125(6), pp. 1275–1287. doi: 10.1083/jcb.125.6.1275.

Rebecca J. *et al.* (2013) 'Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches', *NATURE REVIEWS | GENETICS*, 14(june), pp. 373–378.

Rooney, Jachinta E. *et al.* (2012) 'Laminin-111 protein therapy reduces muscle pathology and improves viability of a mouse model of merosin-deficient congenital muscular dystrophy.', *The American journal of pathology*, 180(4), pp. 1593–602. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.12.019.

Rooney, Jachinta E *et al.* (2012) 'Laminin-111 Protein Therapy Reduces Muscle Pathology and Improves Viability of a Mouse Model of Merosin-Deficient Congenital Muscular Dystrophy', *AJPA*, 180, pp. 1593–1602. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.12.019.

Van Ry, P. M. *et al.* (no date) 'Laminin-111 improves muscle repair in a mouse model of merosin-deficient congenital muscular dystrophy'. doi: 10.1093/hmg/ddt428.

Sarkar, C., Zhang, Z. and Mukherjee, A. B. (2012) 'Stop codon read-through with PTC124 induces palmitoyl-protein thioesterase-1 activity, reduces thioester load and suppresses apoptosis in cultured cells from INCL patients', 104(3), pp. 338–345. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.05.021.Stop.

Schneider, C. A. *et al.* (2017) 'NIH Image to ImageJ : 25 years of Image Analysis', 9(7), pp. 671–675.

Springer, M. ., Rando, T. and Blau, H. M. (1997) 'Isolation and growth of mouse primary myoblasts', *Growth (Lakeland)*, pp. 1–4.

Stern-Straeter, J. *et al.* (2008) 'Characterization of human myoblast cultures for tissue engineering', *International Journal of Molecular Medicine*, 21(1), pp. 49–56. doi: 10.3892/ijmm.21.1.49.

Sunada, Y. *et al.* (1994) 'Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus', *Journal of Biological Chemistry*, 269(19), pp. 13729–13732.

Sunada, Y. *et al.* (1995) 'Identification of a novel mutant transcript of laminin $\alpha 2$ chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice', *Human Molecular Genetics*, 4(6), pp. 1055–1061. doi: 10.1093/hmg/4.6.1055.

Thorne, B. *et al.* (2018) 'Gene therapy', *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 165, pp. 351–399. doi: 10.1007/10_2016_53.

Timpl, R. and Brown, J. C. (1996) 'Supramolecular assembly of basement membranes', *BioEssays*, 18(2), pp. 123–132. doi: 10.1002/bies.950180208.

Tryggvason, K. (2012) 'Recombinant laminin-521'.

Watanabe, M. *et al.* (2016) 'Maintenance of Hepatic Functions in Primary Human Hepatocytes Cultured on Xeno-Free and Chemical Defined Human Recombinant Laminins'. doi: 10.1371/journal.pone.0161383.

Welch, E. M. *et al.* (2007) 'PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations.', *Nature*, 447(7140), pp. 87–91. doi: 10.1038/nature05756.

Witt, R. *et al.* (2017) 'Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering', *BMC Cell Biology*, 18(1), p. 15. doi: 10.1186/s12860-017-0131-2.

Yaffe, David; Saxel, O. (1977) 'Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle', *Nature Publishing Group*, 270, pp. 725–727.

Yan, S. *et al.* (2012) 'High levels of gene expression in the hepatocytes of adult mice, neonatal mice and tree shrews via retro-orbital sinus hydrodynamic injections of naked plasmid DNA', *Journal of Controlled Release*, 161(3), pp. 763–771. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.018.

Yardeni, T., Eckhaus, M. and Morris, H. D. (2011) 'Retro-orbital_injections_in_mice lab Animal 2011.pdf', *Lab Anim (NY)*, 40(5), pp. 155–160. doi: 10.1038/labani0511-155.Retro-orbital.

Yu, Q. *et al.* (2013) 'Omigapil Treatment Decreases Fibrosis and Improves Respiratory Rate in dy2J Mouse Model of Congenital Muscular Dystrophy', *PLoS ONE*, 8(6). doi: 10.1371/journal.pone.0065468.

Yurchenco, P. D. *et al.* (2018) 'Laminin-deficient muscular dystrophy: Molecular pathogenesis and structural repair strategies', *Matrix Biology*. doi: 10.1016/j.matbio.2017.11.009.