



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## **Papel del colágeno VI en la homeostasis del músculo esquelético y el tejido adiposo: Implicaciones en la fisiopatología de las distrofias musculares**

M<sup>a</sup> Àngels Rodríguez García



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License**.

Programa de Doctorado en Biomedicina  
Universidad de Barcelona

**PAPEL DEL COLÁGENO VI EN LA HOMEOSTASIS DEL  
MÚSCULO ESQUELÉTICO Y TEJIDO ADIPOSO:  
IMPLICACIONES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LAS  
DISTROFIAS MUSCULARES**

Memoria presentada por

**M<sup>a</sup>Àngels Rodríguez García**

Para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona



Esta tesis ha sido realizada en el laboratorio de Investigación aplicada en enfermedades neuromusculares de la Fundació Sant Joan de Déu, bajo la dirección de la Dra.Cecilia Jiménez Mallebrera y la tutoría del Dr.Antonio Zorzano Olarte.

La doctoranda

La directora

El tutor

M<sup>a</sup>Àngels Rodríguez García

Cecilia Jiménez Mallebrera

Antonio Zorzano Olarte



"When nothing is sure, everything is possible."

Margaret Drabble



# **AGRADECIMIENTOS**

---



Sou molts els que m'he acompanyat al llarg del temps que ha durat aquest projecte i m'agradaria agrair a cadascú de vosaltres la vostra aportació en fer realitat la meva tesis.

Vull donar les gràcies en primer lloc a la meva directora, la Dra. Cecilia Jiménez, per haver-me donat la oportunitat de realitzar la tesis al seu laboratori. I al Dr. Antonio Zorzano, per ser el meu tutor en aquesta última etapa i donar-me un cop de mà sempre que li he demanat. Així mateix, vull agrair a en David Sebastian del seu laboratori haver-me ajudat en els últims experiments d'aquesta tesis, gràcies per ensenyar-me i resoldre sempre els meus dubtes tan amablement.

No puc deixar de donar les gràcies a l'Anna Maria. La teva pèrdua va ser massa d'hora i sobtada, però vaig tenir temps d'adonar-me'n de la teva passió per la ciència i d'aprendre una mica de tu. Gràcies per contribuir a que aquesta tesis fos possible i per la teva ajuda sempre afectuosa.

M'agradaria agrair a el Dr. Josep Jiménez, la Dr. Anna Gumà i la Dr. Lourdes Ibáñez per les vostres crítiques sempre constructives i per aportar-me una mica del vostre coneixement per a que aquesta tesis continués endavant.

Vull donar les gràcies a tota la gent del laboratori, els que han estat fins ara i els que van ser-hi de passada i ja han marxat. En primer lloc et vull donar les gràcies a tu Sònia, per ser la primera. La que em va ensenyar pràcticament de zero i m'ha acompanyat al llarg de tot aquest temps, primer com a companya i després com amiga. Gràcies per escoltar-me sempre, pels teus consells i per ser com ets. No m'imagino aquesta tesis sense tu! Gràcies a les meves companyes de muscular. A tu Montse, perquè aquesta aventura sense tu hagués estat menys divertida, ningú com tu per treure'm una riulla fins i tot el dia més gris. Gràcies per ser tan bona companya de feina i de descans! Y a ti Mónica, porque has estado un gran apoyo para mí en este último año y he aprendido mucho de ti, siempre mano a mano. Gràcies a tu també Lúcia, sempre amb un somriure des de bon matí, la teva companyia aquests mesos ha estat molt agradable. Us he d'agrar molt a tots els de la tercera planta. A tu Sílvia, per ser la millor organitzadora de plans que conec, però sobretot per ser tan bona consellera i confident i per la teva empatia, ets genial! I a tu Judith, per ser el sol del laboratori i l'ànima de la festa fora d'ell! A ti Óscar, a ti te agradezco ser siempre tan paciente y responder mis preguntas con una sonrisa por muy rocambolescas que fueran, ha sido genial tenerte como compañero. A Débora, que aunque coincidimos solo al principio, te cogí cariño en seguida y siempre que nos vemos es como si no hubiera pasado el tiempo. Recuerdo con mucho cariño las tardes de los viernes contigo y Sònia en el laboratorio, que tiempos! Gracias a David. Por regalarnos esos ratitos de música y por transmitirme que aunque la ciencia a veces es dura, se consigue. Y gracias a Héctor y Alba, siempre que os he necesitado me habéis echado una mano. A la Laura, que ens feia una mica de mama a tots, gràcies pels teus consells i per ser sempre tan cuqui amb mi.

Als amics de la universitat. Perquè vosaltres vau ser-hi des de el principi, molt abans que tot això comencés i aviat farà deu anys... Sense vosaltres aquesta història no tindria sentit. No m'imagino les primeres practiques de citologia, les primeres maratons intensives d'estudis a la biblioteca ni els primers sopars al pis sense tots i cadascun de vosaltres. Carles, què he de dir-te que ja no sàpigues, simplement gràcies per formar part de la meva vida tots aquests anys. Carol, hem crescut juntes durant aquest temps, ho no podem negar, tenim masses aventures a la esquena i totes em fan somriure al recordar-les. Maria, tu ets molt especial, ets tot afecte i optimisme,

## AGRADECIMIENTOS

gràcies per ser-hi sempre. Sílvia, ets un tros de pa, amb tu és impossible no sentir-se a gust. Uri i Raquel, encara que ara sigueu fóra, gràcies per ser-hi de totes maneres des de la distància. I especialment gràcies a tu Núria. Vam començar aquesta aventura en paral·lel i ets la persona que millor m'ha pogut entendre durant aquest trajecte. Ens hem ajudat mútuament, a vegades sense saber-ho i sempre ho hem aconseguit tirar endavant tot juntes. Gràcies per ser el meu far dins la tempesta tantes vegades.

Als amics del poble: la Lídia, la Mandy, la Laia, en Marc, la Inna i la Laura. Gràcies per ser el paréntesis dins la ciència i tot i així escoltar sempre les meves peculiars anècdotes científiques i no deixar de demanar-me'n més.

A mi familia, que se lo debo todo. A mi madre, Puri, por respetarme y apoyarme siempre en cada decisión que he tomado y me ha llevado hasta aquí. Gracias por compartir conmigo mis anhelos, mis inquietudes y mis alegrías durante este largo camino y no dejar nunca de cuidarme y confiar en mí. A mi hermana Alicia. Gracias por estar siempre cerca cuando te he necesitado. Gracias por creer en mí incondicionalmente e intentar siempre entenderme, aunque a veces no sea fácil.

A tu Joan, especialment a tu, perquè una part d'aquesta tesis també és teva. Gràcies per aguantar-me en els dies dolents i sostenir-me i aixecar-me en els encara més dolents. Gràcies per creure sempre en mi més del que sovint jo mateixa ho faig. Gràcies per cuidar-me tant i tant bé i fer que tot semblés tan fàcil. Gràcies per fer-me tant feliç tot aquest temps i donar-li sentit a cada dia que ha passat fins arribar fins aquí.





## **ABREVIATURAS**

---



<b>6MWT</b>	<i>six-minute walk test</i>
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	AND complementario
<b>AFFMI</b>	<i>appendicular free fat mass index</i>
<b>AICAR</b>	5-aminoimidazol- 4-carboxamida ribonucleótido
<b>AKT</b>	proteína quinasa B
<b>AMPK</b>	proteína quinasa activada por AMP
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>AS160</b>	<i>Akt substrate of 160 kDa</i>
<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>BCA</b>	ácido bicinconínico
<b>BM</b>	miopatía de Bethlem
<b>BSA</b>	albúmina de suero bovino
<b>CaMKII<math>\beta</math></b>	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2 beta</i>
<b>Car3</b>	anhidrasa carbónica 3
<b>CCCP</b>	carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
<b>Cox11</b>	cytochrome c oxidase assembly protein 11
<b>Cox6a2</b>	<i>Cytochrome C Oxidase Subunit VIa Polypeptide 2</i>
<b>Cpd22</b>	compuesto 22
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidino-2-fenilindol
<b>db/db</b>	modelo de ratón de diabetes, obesidad y dislipidemia
<b>DMD</b>	distrofia muscular de Duchenne
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle medium
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DXA</b>	<i>dual-energy X-ray absorptiometry</i>
<b>ECAR</b>	<i>extracellular acidification rate</i>
<b>ECL</b>	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>EK2</b>	<i>Egen Klassifikation 2</i>
<b>ELISA</b>	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>ETP</b>	endotrofina
<b>FBS</b>	suero fetal bovino
<b>FGF</b>	factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FMI</b>	<i>fat mass index</i>

## ABREVIATURAS

<b>FVC</b>	<i>forced vital capacity</i>
<b>GLUT</b>	transportadores de glucosa
<b>GLUT1</b>	transportador de glucosa tipo 1
<b>GLUT4</b>	transportador de glucosa tipo 4
<b>GS</b>	glucógeno sintasa
<b>GSK3</b>	glucógeno sintasa quinasa 3
<b>HEPES</b>	4- (2-hidroxietil) -1 ácido piperazinetanosulfónico
<b>HGF</b>	factor de crecimiento de hepatocitos
<b>IBMX</b>	<i>3-isobutyl-1-methylxanthine</i>
<b>ILK</b>	<i>integrin linked kinase</i>
<b>IRS-1</b>	receptor de insulina 1
<b>LGMD</b>	<i>Limb-girdle muscular dystrophy</i>
<b>LKB1</b>	<i>liver kinase B1</i>
<b>LMI</b>	<i>lean mass index</i>
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MEM199</b>	Minimum Essential Media
<b>MFM</b>	<i>Motor Function Measure</i>
<b>miARN</b>	micro ARN
<b>MLPA</b>	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
<b>MME</b>	Membrana mitocondrial externa
<b>MMI</b>	Membrana mitocondrial interna
<b>MMP11</b>	metaloproteinasas de matriz 11/estromelina-3
<b>MRI</b>	imagen por resonancia magnética
<b>Mrps27</b>	<i>mitochondrial ribosomal protein S27</i>
<b>mTOR2</b>	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
<b>Myog</b>	<i>myogenin</i>
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	ortovanadato de sodio
<b>NaF</b>	fluoruro sódico
<b>NaOH</b>	hidróxido de sodio
<b>Ndufa11</b>	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11</i>
<b>NG2</b>	<i>neural/glial antigen 2</i>
<b>NSAA</b>	<i>NorthStar Ambulatory Assessment</i>
<b>Nufaf2</b>	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 2</i>
<b>ob/ob</b>	modelo de ratón diabético
<b>OCR</b>	<i>oxygen consumption rate</i>

<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKD1</b>	quinasa dependiente de fosfatidilinositol 1
<b>PedsQL</b>	<i>Paediatric Quality of Life</i>
<b>PI3K</b>	quinasa fosfoinositol 3
<b>PIP2</b>	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
<b>PIP3</b>	fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
<b><i>Prg4</i></b>	proteoglycan 4
<b>PTP</b>	poro de transición de permeabilidad
<b>PUL</b>	<i>performance of upper limb</i>
<b>RBP4</b>	<i>retinol binding protein 4</i>
<b>RE</b>	retículo endoplasmático
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>SH2</b>	dominio Src Homology 2
<b>SNORs</b>	<i>Small Nucleolar RNA</i>
<b>TAK1</b>	<i>transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
<b>TBC1D1</b>	<i>TBC1 domain family member 1</i>
<b>Tcf/Lef</b>	<i>T-cell factor/lymphoid enhancer factor</i>
<b>TEM</b>	Transición epitelio-mesénquima
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>transforming growth factor beta</i>
<b>Tris</b>	tris (hidroximetil) aminometano
<b>TZD</b>	tiazolidinedionas
<b>UCMD</b>	distrofia muscular congénita de Ullrich
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>



# **TABLA DE CONTENIDOS**

---



<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1	El colágeno VI .....	3
1.1.1	Estructura del colágeno VI .....	4
1.2	Función del colágeno VI .....	6
1.2.1	El colágeno VI como componente estructural .....	6
1.2.2	Papel del colágeno VI en cáncer.....	7
1.2.3	El colágeno VI en tejido adiposo y su posible implicación en el contexto de disfunción metabólica .....	9
1.2.4	Otras funciones del colágeno VI en la célula muscular .....	11
1.3	Miopatías asociadas con déficit de colágeno VI.....	13
1.3.1	Etiología genética .....	14
1.3.2	Características clínicas.....	16
1.3.3	Diagnóstico .....	18
1.3.3.1	Diagnóstico patológico y bioquímico .....	18
1.3.3.2	Resonancia magnética.....	21
1.3.3.3	Diagnóstico genético .....	22
1.4	Vías de señalización implicadas en el control de la glucemia en músculo esquelético.....	23
1.4.1	Vía de señalización PI3K/Akt .....	23
1.4.2	Vía de señalización AMPK .....	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1	Cultivos de líneas celulares .....	33
3.1.1	Cultivos LHCN-M2.....	33
3.1.2	Cultivos C2CC12.....	33
3.1.3	Cultivos L6E9 .....	34
3.1.4	Cultivos 3T3-L1 .....	34

## TABLA DE CONTENIDOS

3.1.5	Cultivos SGBS.....	34
3.2	Pacientes .....	35
3.3	Muestras de tejido humano .....	36
3.3.1	Muestras de músculo .....	36
3.3.2	Muestras de sangre .....	36
3.4	Tratamientos celulares.....	37
3.4.1	Tratamiento para estudios de inhibición de ILK.....	37
3.4.2	Tratamiento para estudios de señalización de colágeno VI.....	37
3.5	Técnicas de obtención, determinación y análisis de proteína .....	37
3.5.1	Obtención de extractos celulares totales.....	37
3.5.2	Obtención de fracción membrana plasmática de extractos celulares.....	38
3.5.3	Obtención de extractos de músculo .....	38
3.5.4	Determinación de la concentración de extractos de proteína .....	38
3.5.5	Análisis de proteínas por Western Blot (WB).....	39
3.5.6	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas .....	41
3.6	Obtención, detección y análisis de RNA.....	41
3.6.1	Obtención de RNA de cultivos celulares .....	41
3.6.2	Determinación de la cantidad y calidad del ARN .....	42
3.6.3	Obtención ARN complementario .....	43
3.6.4	PCR en tiempo real.....	43
3.6.5	Microarray y análisis de datos.....	44
3.7	Estudios metabólicos en células.....	46
3.7.1	Estudios de captación de glucosa.....	46
3.7.2	Determinación de la tasa de síntesis de glucógeno .....	47
3.7.3	Experimentos de respirometría .....	48
3.8	Análisis de composición corporal mediante Absorciometría de rayos X de energía dual (DXA).....	51
3.9	Medición de la función muscular en pacientes con déficit de colágeno VI .....	54

3.10	Estadística.....	55
<b>CAPÍTULO 1</b>		
4	<b>RESULTADOS CAPÍTULO 1</b> .....	59
4.1	Papel del colágeno VI en la captación de glucosa <i>in vitro</i> .....	61
4.1.1	Caracterización del efecto del colágeno VI en la captación de glucosa en células musculares .....	61
4.1.2	Estudio del efecto de los colágeno I y V en la captación de glucosa en células musculares .....	63
4.1.3	Estudio y comparación del efecto de los colágeno I, V y VI en la captación de glucosa en líneas celulares miogénicas y adipocitarias.....	64
4.1.4	Efecto colágeno VI inmovilizado en la captación de glucosa .....	67
4.1.5	Efecto endotrofina en la captación de glucosa .....	68
4.1.6	Efecto del colágeno VI en la síntesis de glucógeno.....	69
4.2	Estudio de la vía implicada en el efecto del colágeno VI y la ETP en la captación de glucosa.....	71
4.2.1	Implicación de ILK en la mediación del efecto de colágeno VI y ETP.....	71
4.2.2	Efecto del colágeno VI en la vía PI3K/Akt.....	74
4.2.3	Efecto del colágeno VI en la vía de señalización AMPK .....	80
4.3	Estado de componentes de las vías PI3K/AKT y AMPK en biopsias musculares de pacientes con mutaciones de colágeno VI.....	81
4.4	Papel del colágeno VI en la regulación génica .....	83
4.4.1	Efecto del colágeno VI en la regulación de la expresión de genes implicados en la vía PI3K/AKT .....	83
4.4.2	Estudio de Microarrays .....	84
4.5	Estudio de los efectos del colágeno VI en la tasa de consumo de oxígeno .....	89
<b>CAPÍTULO 2</b>		
5	<b>RESULTADOS CAPÍTULO 2</b> .....	97
5.1	Estudio de la composición corporal de pacientes con miopatías relacionadas con déficits en colágeno VI. ....	99
5.1.1	Cambios en la cantidad y distribución de masa grasa .....	99

## TABLA DE CONTENIDOS

5.1.2	Cambios en la cantidad y distribución de masa muscular .....	103
5.1.3	Efecto del estado de ambulación en la composición corporal en pacientes con déficit de colágeno VI.....	105
5.1.4	Comparación de la composición corporal de pacientes con distintas distrofias musculares .....	108
5.2	Determinación de adipocinas circulantes en pacientes con miopatías relacionadas con déficits en colágeno VI .....	111
5.2.1	Determinación de los niveles circulantes de adipoquinas en pacientes UCMD.....	113
5.2.2	Determinación de los niveles circulantes de adipoquinas en pacientes BM. ...	116
5.3	Relación entre los cambios de composición corporal, niveles circulantes de adipoquinas y función física en pacientes con déficit de colágeno VI .....	118
5.3.1	Correlación entre la composición corporal y la función motora.....	119
5.3.2	Correlación entre la composición corporal y el perfil de adipoquinas .....	125
5.3.3	Correlación entre la función motora y el perfil de adipoquinas .....	127
6	<b>DISCUSIÓN</b> .....	131
7	<b>CONCLUSIONES</b> .....	153
8	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	157
9	<b>ANEXO</b> .....	183





# 1 INTRODUCCIÓN

---



## 1.1 El colágeno VI

El colágeno es la principal proteína estructural que conforma la matriz extracelular de los diferentes tejidos, proporcionándoles una estabilidad estructural y mecánica (Sherman et al., 2015). Asimismo, tiene un importante papel en la comunicación célula-matriz a través de receptores situados en la superficie celular (Leitinger et al., 2007). En la especie humana existen 28 tipos distintos de colágeno que se agrupan según su estructura y su función (**Tabla 1**). Uno de estos 28 tipos de colágeno es el colágeno de tipo VI.

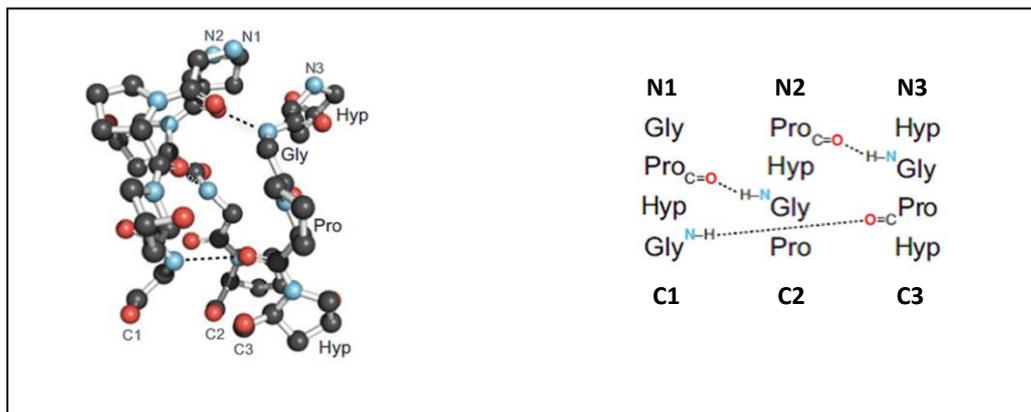
Tipo	Clase	Composición	Distribución	Patología
I	Fibrilar	$\alpha 1[I]2\alpha 2[I]$	Abundante y generalizada: Dermis, hueso, tendón, ligamento	Osteogénesis imperfecta, síndrome Ehlers-Danlos, osteoporosis
II	Fibrilar	$\alpha 1[II]3$	Cartílago, Vítreo	Osteoartritis, Condrod displasia
III	Fibrilar	$\alpha 1[III]3$	Skin, Blood Vessels, Intestine	síndrome de Ehlers-Danlos, aneurismas arteriales
IV	Red	$\alpha 1[IV]2\alpha 2[IV]$ $\alpha 3[IV]\alpha 4[IV]\alpha 5[IV]$ $\alpha 5[IV]2\alpha 6[IV]$	Membranas basales	Síndrome de Alport
V	Fibrilar	$\alpha 1[V]3$ $\alpha 1[V]2\alpha 2[V]$ $\alpha 1[V]\alpha 2[V]\alpha 3[V]$	Generalizada: hueso, dermis, córnea, placenta	Síndrome Ehlers-Danlos
VI	Red ( <i>beaded filaments</i> )	$\alpha 1[VI]\alpha 2[VI]$ $\alpha 3[VI]$ $\alpha 1[VI]\alpha 2[VI]\alpha 4[VI]$	Generalizada: hueso, dermis, córnea, placenta, cartílago	Miopatía de Bethlem y distrofia muscular congénita de Ullrich
VII	Fibras de anclaje	$\alpha 1[VII]2\alpha 2[VII]$	Dermis, vejiga	Epidermólisis ampollar
VIII	Red (hexagonal)	$\alpha 1[VIII]3$ ; $\alpha 2[VIII]3$ $\alpha 1[VIII]2\alpha 2[VIII]$	Generalizada: Dermis, cerebro, corazón, riñón	Distrófia de Fuchs
IX	FACIT	$\alpha 1[IX]\alpha 2[IX]\alpha 3[IX]$	Cartílago, córnea, vítreo	Osteoartritis, displasia epifisaria múltiple
X	Red (hexagonal)	$\alpha 1[X]3$	Cartílago	Condrod displasia
XI	Fibrilar	$\alpha 1[XI]\alpha 2[XI]\alpha 3[XI]$	Cartílagos, discos intervertebrales	Condrod displasia, osteoartritis
XII	FACIT	$\alpha 1[XII]3$	Dermis, tendón	
XIII	MACIT	–	Células endoteliales, dermis, ojos, corazón	
XIV	FACIT	$\alpha 1[XIV]3$	Generalizada: hueso, dermis, cartílago	
XV	MULTIPLEXIN	–	Capilares, testículos, riñón, corazón	
XVI	FACIT	–	Dermis, riñón	
XVII	MACIT	$\alpha 1[XVII]$	Hemidesmosomas en epitelios	Epidermólisis ampollosa
XVIII	MULTIPLEXIN	–	Membrana basal, hígado	Síndrome de Knobloch
XIX	FACIT	–	Membrana basal	
XX	FACIT	–	Córnea (pollo)	
XXI	FACIT	–	Estómago, riñón	
XXII	FACIT	–	Uniones de tejido	
XXIII	MACIT	–	Corazón, retina	
XXIV	Fibrilar	–	Hueso, córnea	
XXV	MACIT	–	Cerebro, corazón, testículos	Formación de amiloide
XXVI	FACIT	–	Testículo, ovario	
XXVII	Fibrilar	–	Cartílago	
XXVIII	–	–	Dermis, nervio ciático	Enfermedad neurodegenerativa

**Tabla 1: Descripción de los tipos de colágeno, su composición y distribución.** La última columna muestra las patologías que han sido asociadas a cada uno de ellos. Las siglas FACIT corresponden a “Fibril-associated collagens with interrupted triple helices” y las siglas MACIT a “Membrane-associated collagens with interrupted triple helices”. Tabla adaptada de (Pandav et al., 2014).

## INTRODUCCIÓN

### 1.1.1 Estructura del colágeno VI

Los distintos tipos de colágeno comparten una estructura básica en forma de triple hélice formada por tres cadenas peptídicas que contienen repeticiones Gly-X-Y (siendo X y Y cualquier aminoácido, mayoritariamente prolina e hidroxiprolina) (Heino, 2007).



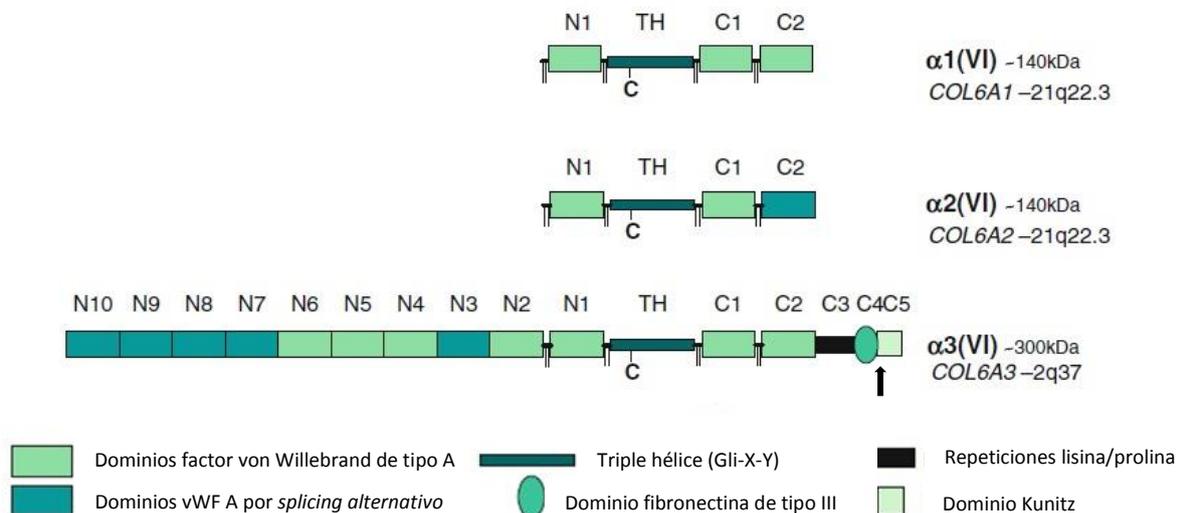
**Figura 1: Esquema de la conformación de la triple hélice de colágeno.** Se indican los extremos N-terminales de cada cadena (N1; N2 y N3) y los extremos C-terminales (C1; C2 y C3) y los residuos glicina (Gly), prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp). Imagen adaptada de (Pandav et al., 2014).

Como podemos apreciar en la anterior tabla, el colágeno VI es el único tipo de colágeno con una estructura “beaded filament”, es decir, está formado por filamentos con regiones cortas de triple hélice flanqueadas por dominios globulares conocidos como dominios factor von Willebrand de tipo A (**Figura 2**). La triple hélice de colágeno VI está compuesta por tres cadenas  $\alpha$  principalmente en la combinación  $\alpha 1[\text{VI}]\alpha 2[\text{VI}]\alpha 3[\text{VI}]$ , aunque más recientemente se han descrito en ratón otras tres cadenas ( $\alpha 4[\text{VI}]$ ,  $\alpha 5[\text{VI}]$  y  $\alpha 6[\text{VI}]$ ) de secuencia y estructura similar a la cadena  $\alpha 3$  que pueden reemplazarla en la triple hélice de colágeno VI (Gara et al., 2008). En humanos se ha demostrado la expresión de las cadenas  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ , sin embargo el gen que codifica la cadena  $\alpha 4$  está inactivado por lo que no la encontraremos expresada (Tagliavini et al., 2014) (Sabatelli et al., 2011).

Cada una de estas cadenas es codificada a partir de un gen específico: *COL6A1*, *COL6A2*, *COL6A3*, *COL6A4*, *COL6A5* y *COL6A6*.

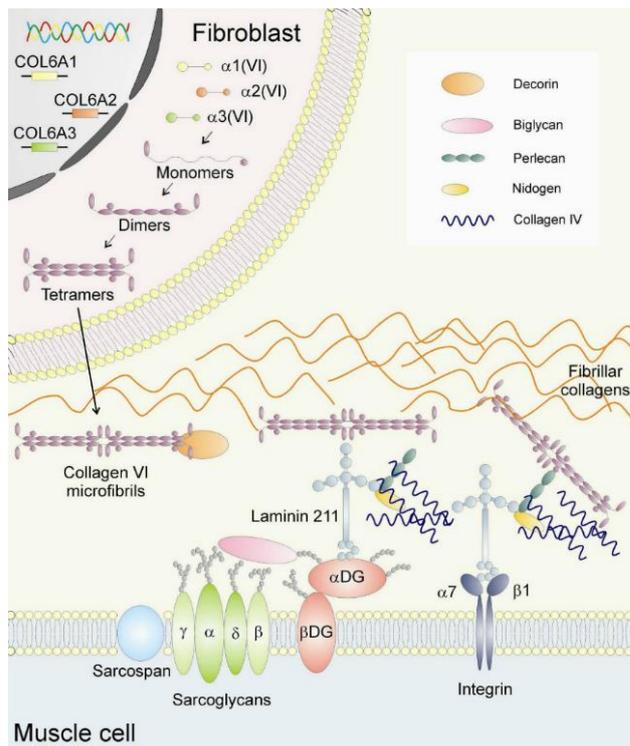
Las cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  tienen un peso similar de 140-150kDa (kilodaltons). La cadena  $\alpha 3$ , la más larga de todas las que componen la triple hélice de colágeno VI (según la variante de *splicing* alternativo 250-300 kDa), sufre una serie de modificaciones postraduccionales después de su síntesis y secreción que resultan en la escisión del dominio globular C-terminal de tipo Kunitz. Este fragmento liberado de la cadena  $\alpha 3$  del colágeno VI es conocido con el nombre de endotrofina (ETP) (Aigner et al., 2002). El proceso enzimático por el cual se libera el fragmento

endotrofina y las moléculas implicadas en él es aún desconocido, no obstante, estudios recientes han demostrado que la metaloproteinasas de matriz 11/estromelina-3 (MMP11), es capaz de cortar la cadena  $\alpha 3$  de colágeno VI (Motrescu et al., 2008), lo que la convierte en una enzima candidata para la escisión de la endotrofina.



**Figura 2: Diagrama a de la organización de las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  que forman la triple hélice de colágeno VI.** “TH” representa la triple hélice común en todas las cadenas, flanqueada por un número variable de dominios del factor von Willebrand de tipo A (vWF A). La letra “C” de la triple hélice muestra los residuos cisteína involucrados en la unión de las tres cadenas. Los dominios C-terminales adicionales de la cadena  $\alpha 3$  están indicados como C3, C4 y C5 (dominio Kunitz). La flecha en la cadena  $\alpha 3$  indica el lugar de escisión del producto liberado endotrofina. Imagen adaptada de (Bushby et al., 2014).

La célula encargada de sintetizar las cadenas  $\alpha$  de colágeno VI son los fibroblastos. Las cadenas individuales ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) se ensamblan dentro del fibroblasto a partir de su extremo C-terminal para formar el monómero de colágeno VI. El monómero de colágeno VI, a su vez, se alinearán de manera antiparalela a otros monómeros mediante enlaces disulfuro entre residuos de cisteínas para formar dímeros y estos a su vez tetrámeros (Colombatti et al., 1995)(Engel et al., 1985) que serán secretados por la célula a la matriz pericelular. Una vez en la matriz, se unirán mediante sus extremos formando la red de microfibrillas e interactuará con otros colágenos (Kuo et al., 1997) y componentes de la matriz extracelular, además de participar en numerosos procesos de señalización (Allamand et al., 2011).



**Figura 3: Proceso de síntesis y secreción del colágeno VI.** Los fibroblastos de la matriz extracelular se encargan de sintetizar las tres cadenas de colágeno VI a partir de cada uno de sus correspondientes genes. Las cadenas se unirán por sus dominios de triple hélice formando monómeros, dímeros y finalmente tetrámeros que se secretaran fuera de la célula para formar la red de microfibrillas. Podemos observar algunas de las interacciones del colágeno VI con otros componentes de la matriz extracelular como son la proteína perlecan, decorina y otros tipos de colágeno.

## 1.2 Función del colágeno VI

### 1.2.1 El colágeno VI como componente estructural

El colágeno VI, forma parte de la matriz extracelular de numerosos tejidos como son la piel (Theocharidis et al., 2016) el músculo, tejido adiposo (Iyengar et al., 2005), pulmones, córnea, nervios periféricos y cerebro (Cheng et al., 2009) entre otros.

Entre las diversas funciones que lleva a cabo, el colágeno VI tiene un importante papel estructural y de organización en la matriz extracelular que rodea distintos tipos celulares debido a las múltiples interacciones que efectúa con otros componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal que rodea la célula como se detalla a continuación.

Una vez secretadas a la matriz, las microfibrillas de colágeno VI son capaces de unirse a otros tipos de colágeno como son el tipo II y IV (C. Wiberg et al., 2003) (Kuo, et al.1997). Asimismo, existe una unión directa entre el colágeno VI y los proteoglicanos decorina y biglicano (Charlotte Wiberg et al., 2001). Otras proteínas de la matriz extracelular, como las glicoproteínas tenascina-X, fibulina de tipo II y la glicoproteína 1 asociada a microfibrillas (MAGP-1), también han

mostrado afinidad de unión a la molécula de colágeno VI (Minamitani et al., 2004) (Sasaki et al., 1995) (Finnis et al., 1997).

La interacción del colágeno VI con otros elementos que componen la macroestructura de la matriz extracelular determina que, en situaciones donde se vea afectada la función del colágeno VI, se ocasionen en consecuencia alteraciones en la organización de otros componentes (Sabatelli et al., 2001) así como una disminución en la adhesión de la célula a la matriz extracelular (Kawahara et al., 2007)(Kawahara et al., 2008).

En relación a estas evidencias, en varios estudios realizados en nuestro laboratorio se analizó la expresión génica global en músculos y fibroblastos pertenecientes a pacientes con mutaciones en genes de colágeno VI en comparación a sujetos sanos. Los resultados obtenidos manifestaron cambios de expresión en genes codificantes para componentes de la matriz extracelular y receptores de membrana poniendo en evidencia una alteración en la organización de la matriz extracelular y su interacción con la célula dando lugar a cambios en la propiedades de adhesión de las células a distintos sustratos de la matriz extracelular como es la laminina (Paco et al., 2013) (Paco et al., 2015).

Además de este papel estructural, el colágeno VI desempeña varias funciones como molécula señalizadora. Estas funciones han sido investigadas principalmente en procesos de tumorigénesis y en tejido adiposo y, en menor medida, en músculo.

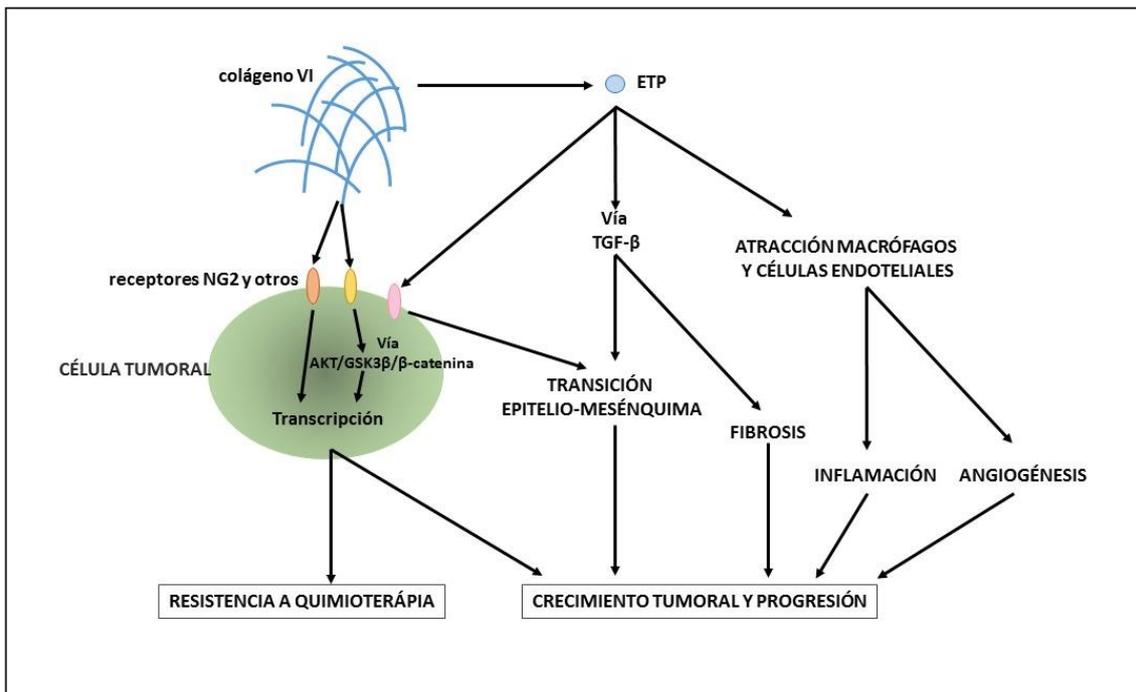
### **1.2.2 Papel del colágeno VI en cáncer**

Son varios los trabajos que describen una relación directa entre el colágeno VI y su acción como estimulador de la fibrosis en la progresión de procesos de tumorigénesis de distintos tipos de cáncer (P. Chen et al., 2013). Una prueba es como los niveles de expresión de la proteína de colágeno VI en la matriz extracelular que rodea tumores ováricos correlacionan con el grado de agresividad del tumor y su resistencia a tratamientos quimioterapéuticos (Sherman-Baust et al., 2003). O como ratones deficientes en colágeno VI inyectados con células tumorales a nivel cerebral tienen un crecimiento tumoral retardado respecto los ratones inyectados y sin déficit de colágeno VI (You et al., 2012). Otro ejemplo es la observación de como células de melanoma transducidas para sobreexpresar TGF- $\beta$  inducen la producción de colágeno VI mediante la activación de los fibroblastos localizados en la piel facilitando la progresión del tumor (Berking et al., 2001).

## INTRODUCCIÓN

Así mismo, no solo la molécula entera de colágeno VI puede intervenir en procesos de proliferación de tumores, sino que el extremo C-terminal de la cadena  $\alpha 3$  del colágeno VI, la endotrofina (ETP), puede por sí sola participar en procesos de fibrosis permitiendo, a través de la inducción de la conversión de células epiteliales en células migratorias (transición epitelio-mesénquima), el crecimiento tumoral y la metástasis actuando como un coestimulador de la vía de señalización del TGF $\beta$  y activando señales Wnt/ $\beta$ -catenina. La ETP por si misma también participa regulando la producción de factores inflamatorios secretados por macrófagos atraídos por la ETP, lo cual favorece aún más el crecimiento y la progresión del tumor (Park et al., 2012).

El papel del colágeno VI en la progresión tumoral, no solo se limita a la participación en procesos fibróticos e inflamatorios. Los trabajos de Iyengar y colegas (Iyengar et al., 2003)(Iyengar et al., 2005) establecen una importante labor del colágeno VI como molécula señalizadora en el contexto de la proliferación tumorigénica de las células epiteliales ductales afectadas en el cáncer de mama a través de la activación de programas pro-mitogénicos. El mecanismo propuesto se basa en la capacidad del colágeno VI, secretado por los adipocitos que rodean la célula tumoral, de unirse a los receptores NG2 y, posiblemente otros receptores como la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha 1\beta 1$ , situados en la superficie de la célula. La unión al receptor produce una fosforilación de GSK3 $\beta$ , posiblemente a través de su efector Akt, que produce una estabilización de la  $\beta$ -catenina, la cual viaja al núcleo activando los factores de transcripción Tcf/Lef que, a su vez, regularían de manera positiva la ciclina D provocando, en consecuencia, una progresión no controlada en el ciclo celular (Shtutman et al., 1999).



**Figura 4: Esquema de las principales contribuciones del colágeno VI a los procesos de tumorigénesis y resistencia a terapias.** El colágeno VI altamente expresado en tumores participa a través de la unión a receptores NG2 y otros aún desconocidos en vías de señalización que desembocaran en un aumento del crecimiento tumoral o induciendo resistencia a quimioterapia. La ETP participará en procesos de transición epitelio-mesénquima o procesos de fibrosis a través de la vía activada por TGF- $\beta$ . Por otro lado, promoverá la atracción de macrófagos y células epiteliales que favorecerán el proceso de inflamación y angiogénesis que acompaña el crecimiento y progresión del tumor. Imagen adaptada de (P. Chen et al., 2013).

### 1.2.3 El colágeno VI en tejido adiposo y su posible implicación en el contexto de disfunción metabólica

Como se comentó anteriormente, uno de los tejidos en cuya matriz se encuentra altamente expresado el colágeno VI es el tejido adiposo, siendo el tipo de colágeno más abundante (Khan et al., 2009)(Scherer et al., 1998).

El colágeno VI juega un importante papel en la correcta diferenciación y expansión del tejido adiposo participando en la remodelación de la matriz extracelular que rodea el adipocito mediante la modificación de la estructura de su propia red de colágeno VI. Conjuntamente al colágeno de tipo V, el colágeno VI muestra una estructura en forma de fibrillas finas y espinosas en las primeras etapas de diferenciación del adipocito, para luego desaparecer y ser reemplazadas por una red de fibras gruesas a los diez días desde el inicio de la diferenciación en

## INTRODUCCIÓN

células de la línea preadiposa intramuscular bovina (BIP, *bovine intramuscular preadipose*) (Nakajima et al., 2002). En relación al aumento de tejido adiposo, la leptina, una citoquina liberada por el tejido adiposo, ve incrementados sus niveles y estos pueden regular directamente de manera negativa los niveles de *COL6A3* en humanos (McCulloch et al., 2015).

Del mismo modo, estudios en modelos animales y en sujetos humanos han descrito un aumento de expresión de genes de colágeno VI (principalmente *COL6A3*) en tejido adiposo de ratones obesos (*db/db* y *ob/ob*) en relación a ratones control (Khan et al., 2009) así como en humanos en situaciones de mayor ingesta de alimento y en personas obesas, tanto en el tejido adiposo visceral como subcutáneo (Khan et al., 2009) (Pasarica et al. 2009.), aunque existe controversia sobre esta afirmación (McCulloch et al., 2014).

En el proceso de proliferación del tejido adiposo propio de un estado de obesidad, a medida que aumenta el tamaño de los adipocitos, tiene lugar un aumento y remodelación del contenido fibroso conectivo a través de la sobreexpresión de proteínas de la matriz, incluido el colágeno y entre ellos el colágeno de tipo VI. Este aumento del contenido de matriz extracelular, al que denominamos fibrosis, convierte el tejido adiposo en una estructura más rígida debido a la reducción de su elasticidad. Como consecuencia, hay una disrupción de la correcta expansión del adipocito y se sobreviene una deposición ectópica de depósitos lipídicos y una infiltración de macrófagos contribuyendo al estado de inflamación que caracteriza un estado del síndrome metabólico (Khan et al., 2009)(Alkhouli et al., 2013) (Henegar et al., 2008)(Sun et al., 2013).

El colágeno VI no solo está involucrado en procesos de desregulación metabólica por su papel como proteína estructural de la matriz extracelular, sino que posiblemente juega un papel en el proceso inflamatorio que acompaña la obesidad (Pasarica et al., 2009).

Los macrófagos, concretamente los tipo 2 (M2) son capaces de producir colágeno VI tanto en humanos como ratones (Gualandi et al., 2011)(Schnoor et al., 2008). La sobreproducción de colágeno VI por parte de macrófagos M2 contribuye a la fibrosis del tejido adiposo, a su vez desencadenando uno de los rasgos distintivos del síndrome metabólico, paralelo al estado de inflamación, la presencia de un estado de resistencia a insulina (Spencer et al., 2010).

Se han detectado niveles incrementados de colágeno VI en el músculo y riñones de pacientes con resistencia a insulina (Berria et al., 2006) (Mohan et al., 1990) así como una regulación directa de los niveles de expresión de colágeno VI inducida por concentraciones elevadas de glucosa (Muona et al., 1993). Estas evidencias conjuntamente con el papel del colágeno VI en la

remodelación de la matriz extracelular durante la proliferación del tejido adiposo en la obesidad dibujan un nexo entre el colágeno VI y la disfunción metabólica.

Apoyando estas observaciones, modelos de ratón *ob/ob* (ratón obeso con resistencia a insulina) con ausencia de colágeno VI o bien ratones con ausencia de colágeno VI y mantenidos con una dieta alta en grasas han revelado una reducción de la cantidad de fibrosis, una correcta expansión de los adipocitos así como una disminución de la infiltración de macrófagos y finalmente una mejora de los parámetros metabólicos alterados incluida la sensibilidad a insulina en comparación con los ratones *ob/ob* o aquellos mantenidos con dieta grasa, pero sin alteraciones en colágeno VI (Khan et al., 2009).

Estudios recientes han demostrado que también el fragmento C-terminal soluble del colágeno VI, la ETP, se encuentra altamente involucrado en el proceso que conlleva a la disfunción metabólica. El uso de un modelo de ratón con sobreexpresión local a nivel de tejido adiposo de la endotrofina reveló que esta es capaz de inducir un estado fibrótico en el tejido adiposo mediante la activación de fibroblastos que provocaran una sobreexpresión de otros colágenos y componentes de la matriz extracelular. Asimismo, el colágeno VI puede actuar como quimioatrayente para macrófagos que participan en el proceso de inflamación del tejido adiposo que, junto a la fibrosis, estimularan un estado de resistencia a insulina (**Figura 4**). De manera parecida, ratones expuestos a una dieta alta en grasa inyectados con anticuerpo específico de bloqueo de la endotrofina antes y durante la exposición a la dieta grasa, revirtieron parcialmente la resistencia a insulina y la inflamación observada en aquellos no tratados (Sun et al., 2014).

#### **1.2.4 Otras funciones del colágeno VI en la célula muscular**

Estudios realizados en modelos animales de déficit de colágeno VI, así como en cultivos de mioblastos de pacientes con defectos en colágeno VI han demostrado un papel del colágeno VI en la prevención de la apoptosis de la fibra muscular a través de la regulación de la muerte celular mediada por la mitocondria (Bernardi et al., 2008) (Irwin et al., 2003).

La muerte celular mediada por la mitocondria puede ocurrir a través de una vía extrínseca activada a partir de señales provenientes del exterior celular o a través de la vía intrínseca, activada por estímulos intracelulares.

## INTRODUCCIÓN

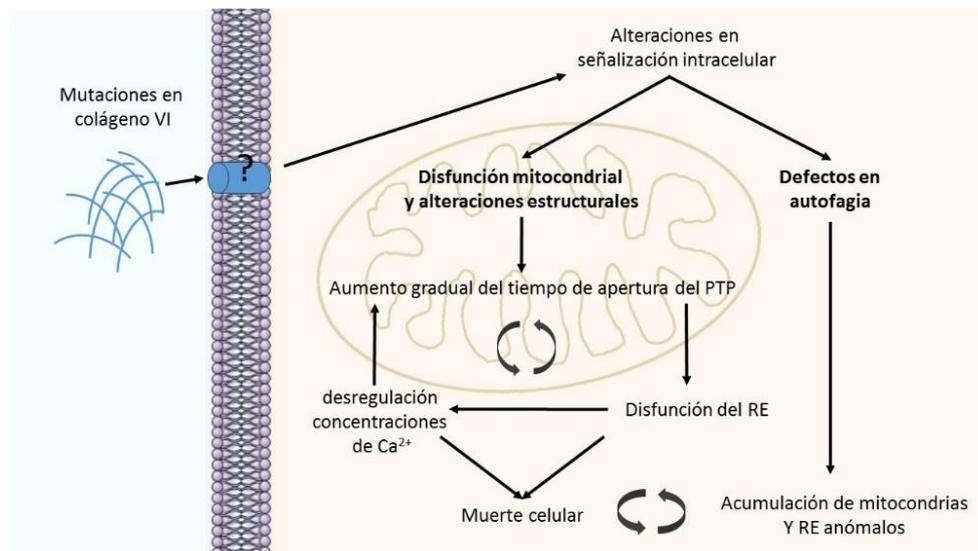
En la vía intrínseca, la cascada de muerte celular mediada por caspasas que provocaran la fragmentación del ADN y la muerte celular por apoptosis se inicia con la formación del apoptosoma, compuesto entre otras, por la proteína mitocondrial citocromo C. Para la creación del apoptosoma se necesita la salida del citocromo C del interior de la mitocondria lo cual tiene lugar gracias un aumento de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MME). Uno de los mecanismos por el cual se pretende explicar este aumento necesario de permeabilidad es la abertura del poro de transición de permeabilidad (PTP) que se encuentra en la membrana mitocondrial interna (MMI) (D. R. Green et al., 2004). La abertura prolongada del PTP provoca cambios estructurales en las crestas de la MMI y cambios fisiológicos provocando una despolarización por la pérdida del potencial de membrana. Este cambio del potencial de membrana provoca un desacople y disminución de la síntesis de ATP desembocando en una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno. Estas, producirán una liberación masiva de iones  $\text{Ca}^{2+}$  por parte la mitocondria lo que aumentará aún más el tiempo de apertura del PTP actuando como un ciclo de retroalimentación positiva que finalmente resultará en la muerte celular (Kroemer et al., 2007).

Tanto en los modelos animales de ratón y pez cebra como en mioblastos humanos (Irwin et al., 2003) (Telfer et al., 2010)(Angelin et al., 2007), se ha observado que, ante defectos en colágeno VI, la estructura de la mitocondria se ve alterada mostrando crestas de la MMI con forma tubular y un aumento de material denso en la matriz. También se aprecian dilataciones en el retículo endoplasmático a nivel macroscópico (Irwin et al., 2003). Estas alteraciones estructurales van acompañadas de un disfunción metabólica debido a alteraciones en la obertura del el PTP que desembocan en un aumento de apoptosis, la cual se ve revertida al tratar con ciclosporina A, un inhibidor del PTP (Merlini et al., 2008). No obstante, el fenómeno de apoptosis observado tiene sus contradicciones al estudiar la ausencia de miofibras apoptóticas en biopsias de pacientes con mutaciones en colágeno VI, por lo que no lo podemos considerar un mecanismo universal (Paco et al., 2012).

En paralelo a los defectos mitocondriales nombrados, parece existir una autofagia defectuosa que acompaña la acumulación de retículo endoplasmático y mitocondrias anómalas participando en el proceso apoptótico (Grumati et al., 2010). Este fenómeno de autofagia deficiente ha sido observado tanto en modelos de ratones deficientes en colágeno VI como en pacientes con defectos en colágeno VI. Los modelos de ratones con déficit de colágeno VI han revelado una activación persistente de la vía Akt-mTOR, implicada, entre otros muchos procesos celulares vitales, en la regulación del proceso de autofagia (Hay, 2011). Asimismo también se ha observado, tanto en músculo de pacientes como en los modelos de ratón con déficit de

colágeno VI, una reducción en los niveles Beclina-1 y Bnip3, dos proteínas involucradas en la correcta formación del autofagosoma. Esta disminución observada en el flujo de autofagia puede ser reestablecida, según estudios recientes en el modelo de ratón tras el tratamiento con espermidina, un compuesto natural inductor de la autofagia (Chrisam et al., 2015).

A pesar de todas estas evidencias, el mecanismo por el cual los defectos en colágeno VI desencadenan estas alteraciones de la función celular (función mitocondrial, muerte celular y autofagia) son aún desconocidas.



**Figura 5: Mecanismo propuesto para la patogénesis asociada a los defectos mitocondriales relacionados con colágeno VI.** Las alteraciones en colágeno VI afectan a vías de señalización intracelular provocando disfunciones y cambios estructurales en las mitocondrias y RE así como defectos en los mecanismos de apoptosis. Los cambios mitocondriales provocan un aumento de la abertura del PTP y una defectiva regulación de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del RE participando en una apertura prolongada del PTP creando un circuito de retroalimentación positiva que desemboca en una muerte celular agravada por la autofagia defectuosa de orgánulos alterados. Imagen adaptada de (Bernardi, 2008).

### 1.3 Miopatías asociadas con déficit de colágeno VI

Dentro de las miopatías relacionadas con colágeno VI distinguimos la distrofia muscular congénita de Ullrich (UCMD) (OMIM#254090) y la miopatía de Bethlem (BM) (OMIM#158810). Otras dos condiciones patológicas se incluyen en el grupo de miopatías relacionadas con colágeno VI: la mioesclerosis miopática autosómica recesiva (OMIM#255600) (L Merlini et al., 2008) y la distrofia muscular de cinturas autosómica dominante (LGMD, de *Limb-girdle muscular dystrophy* en inglés) (OMIM#159001) (Bushby et al., 2014).

## INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular congénita de Ullrich fue la primera de estas patologías descrita en 1930 en niños recién nacidos por el doctor alemán Otto Ullrich y la llamó “scleroatonic muscular dystrophy”. Fue cuatro décadas más tarde, en 1976 cuando Bethlem y van Wijngaarden describieron en tres familias alemanas los primeros casos de lo que posteriormente en 1988 sería llamado, por Mohire y sus compañeros (Mohire et al., 1988), como miopatía de Bethlem. Ambas patologías están clasificadas en el conjunto de enfermedades raras, dado que su prevalencia en la población es inferior a 50 afectados por cada 100000 habitantes (Institute of Medicine (US) Committee on Accelerating Rare Diseases Research and Orphan Product Development, 2010). Su prevalencia nivel mundial no se conoce con certeza, ya que no hay datos suficientes y afecta a una gran diversidad de etnias (Muntoni et al., 2004). En el caso de la distrofia muscular congénita de Ullrich la prevalencia estimada es de tan solo 0.13:100,000 y en la miopatía de Bethlem, de 0.77:100,000 (Norwood et al., 2009). No obstante, de entre los 33 tipos de distrofia muscular congénita descritos hasta el momento, la distrofia muscular congénita de Ullrich es una de las formas más comunes (O’Grady et al., 2016) (Clement et al., 2012).

### 1.3.1 Etiología genética

Las miopatías relacionadas con colágeno VI deben su nombre a las mutaciones en uno de los tres genes que codifican para las tres cadenas de la proteína extracelular colágeno VI. Estos genes son *COL6A1*, *COL6A2* y *COL6A3* (localización cromosómica 21q22.3; 21q22.3 y 2q37.3 respectivamente).

Inicialmente se describió un patrón de herencia autosómico recesivo en la distrofia muscular congénita de Ullrich, sin embargo, en los últimos años se han descrito múltiples casos causados por mutaciones dominantes (a menudo *de novo*), llegando a representar el 50% de los casos diagnosticados de UCMD.

Las mutaciones más frecuentes son las mutaciones puntuales y saltos de exón. Las mutaciones puntuales normalmente afectan a residuos de glicina en el dominio de triple hélice de cada una de las cadenas alfa, crucial para la formación del monómero de colágeno ( $\alpha1\alpha2\alpha3$ ) (Lampe et al., 2005). Por otro lado, los saltos de exón están causados por mutaciones en regiones de corte y empalme (*splicing*) siendo la más frecuente la que afecta al exón 16 del gen *COL6A3* resultando en una cadena  $\alpha3(VI)$  con una delección de 18 aminoácidos en el dominio de triple hélice, por lo

que el monómero de colágeno VI generado contendrá una cadena mutada que ejercerá un efecto dominante negativo sobre los monómeros formados por cadenas no alteradas genéticamente (Bolduc et al., 2014) (Lampe et al., 2008).

Por otra parte, algunas de las mutaciones con herencia autosómica recesiva descritas, son producidas por codones STOP prematuros que resultan en la producción reducida de la cadena afectada y por lo tanto del monómero de colágeno VI, cuyo efecto en el paciente suele ir relacionado con las formas más severas de la enfermedad (Briñas et al., 2010).

Por el contrario, aunque inicialmente, se relacionó la miopatía de Bethlem con un patrón de herencia autosómico dominante (Jöbsis et al., 1996) en la actualidad se conoce que también puede deberse a mutaciones con una herencia autosómica recesivas y *de novo* (Bönnemann et al., 2014).

Una de las mutaciones más frecuentes reportadas en pacientes BM son aquellas mutaciones puntuales que se encuentran en la región N-terminal del dominio de triple hélice en cualquiera de los tres genes, que aunque permite la correcta formación de la triple hélice, esta es incapaz de formar tetrámeros de forma antiparalela y, por lo tanto, impide la formación de la red de microfibrillas lo cual tendrá un efecto negativo dominante parecido a lo observado en algunos pacientes UCMD (Lamandé et al., 2002). Mutaciones resultantes en saltos de exón también han sido descritas en la miopatía del Bethlem, a diferencia de UCMD, el exón afectado suele ser el exón 14 del gen *COL6A1*, no obstante la consecuencia, como en UCMD, es un efecto dominante negativo.

Es difícil aun hoy en día establecer una correlación entre el genotipo y fenotipo en las miopatías relacionadas con déficits en colágeno VI dado que, aun y la existencia de mutaciones descritas específicamente en pacientes UCMD o BM, existen mutaciones presentes en ambas patologías (O'Grady et al., 2016).

Aun así, en su gran mayoría, las mutaciones en los genes *COL6A1*, *COL6A2* y *COL6A3* tendrán como consecuencia o bien un ensamblaje defectuoso de los monómeros, dímeros y tetrámeros que provocarán una disminución en la secreción de colágeno VI a la matriz extracelular. O bien, aun y no verse afectada la correcta formación de monómeros, dímeros y tetrámeros, por lo que podrán ser secretados a la matriz extracelular, una vez allí, serán incapaces de unirse entre ellos para formar la red de microfibrillas y tampoco se podrán unir a otros componentes de la matriz. En ambas situaciones el resultado será un déficit parcial de colágeno VI en la matriz extracelular.

A parte de mutaciones en los genes *COL6A1*, *COL6A2* y *COL6A3*, se han descrito mutaciones en humanos con una clínica resultante similar a la observada en las miopatías relacionadas con

## INTRODUCCIÓN

colágeno VI, en el gen *COL12A1* (localización cromosómica 6q13-q14), el cual codifica para la cadena  $\alpha 1$  del colágeno de tipo XII. Estas mutaciones fueron identificadas en dos hermanos con herencia autosómica recesiva con una afectación severa parecida a UCMD causada por una completa ausencia de colágeno XII debida a la pérdida del exón 50 del transcrito de colágeno XII. Fue esta similitud clínica con UCMD lo que llevó a designar esta distrofia como UCMD2 (OMIM#616470) (Zou et al., 2014). Por otra parte, una mutación *de novo* con un efecto dominante negativo fue hallada en un niño con una clínica parecida a la miopatía de Bethlem (Zou et al., 2014). Y otras dos mutaciones puntuales en el gen de colágeno XII se han descrito en dos familias con una herencia autosómica dominante (Hicks et al., 2014) con una presentación clínica compatible con BM, por lo que se ha acuñado el nuevo término BM2 (OMIM#616471) para englobar estas nuevas miopatías.

### 1.3.2 Características clínicas

#### **Distrofia muscular congénita de Ullrich**

En UCMD la presentación de los primeros síntomas suele ocurrir durante el periodo neonatal o bien durante el primer año de vida. Uno de los primeros síntomas que se pueden apreciar desde los inicios de la enfermedad son la hipotonía en el nacimiento (Nadeau et al., 2009), la presencia de contracturas en las articulaciones proximales así como una hiperlaxitud distal (ej.: dedos) y debilidad muscular. La debilidad muscular en los pacientes es progresiva y en algunos casos tan severa desde el nacimiento que impide el desarrollo de la habilidad para andar representando las formas más severas de la enfermedad (Bönnemann, 2011). Los pacientes afectados con las formas de presentación conocidas como “progresivas moderadas” suelen llegar a andar, aunque pierden esta capacidad de forma autónoma alrededor de los 12 años de edad.

A diferencia de otras distrofias musculares congénitas, los niveles en sangre de creatina quinasa (CK), suelen ser normales o moderadamente elevados en los pacientes UCMD (Yonekawa & Nishino 2015). Esta enzima se libera al torrente sanguíneo cuando la membrana de la célula muscular está dañada y se emplea como marcador para orientar el diagnóstico de las enfermedades neuromusculares (Bönnemann et al., 2014) (Yonekawa et al., 2015).

Una complicación frecuente es la escoliosis la cual suele aparecer en los primeros años de vida aun cuando los pacientes caminan de manera independiente (Nadeau et al., 2009). La aparición de escoliosis suele agravar otro de los signos que se presenta a lo largo de la progresión de la

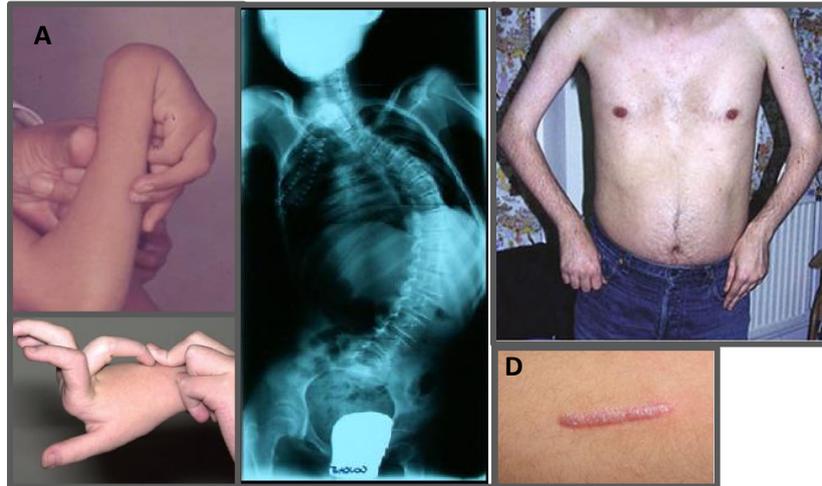
enfermedad, la insuficiencia respiratoria, obligando a muchos pacientes a tener un soporte ventilatorio no invasivo. La progresión de esta insuficiencia respiratoria ha sido monitorizada en pacientes UCMD mediante el registro del FVC (*forced vital capacity* en inglés), que nos informa de la cantidad máxima de aire que un paciente es capaz de expulsar tras una inhalación máxima, poniendo de manifiesto que la mayor reducción en el FVC desde el inicio de la enfermedad se da durante la primera década de vida (Yonekawa et al., 2013) (Foley et al., 2013). El fallo respiratorio suele ser una de las principales causa de mortalidad en los pacientes UCMD durante la segunda década de vida (Mercuri et al., 2002).

Además los pacientes UCMD presentan alteraciones cutáneas como hiperqueratosis folicular y defectos de cicatrización en forma de lesiones queloides o cicatrices atróficas asociado al papel del colágeno VI durante la remodelación de la matriz extracelular que tiene lugar en el proceso de cicatrización (Theocharidis et al., 2016) (Paco et al., 2015) .

### **Miopatía de Bethlem**

La miopatía de Bethlem se caracteriza por una progresión de la clínica mucho más lenta que en el caso de UCMD. Aunque hay pacientes BM que manifiestan los primeros signos durante el periodo neonatal, la aparición suele darse durante la infancia o la juventud. Del mismo modo que en UCMD, suelen presentar debilidad muscular y contracturas en articulaciones distales, sin embargo, suelen conservar la deambulación y no es hasta la edad adulta cuando algunos pacientes necesitan ayuda para andar (Deconinck et al., 2014). Los problemas de cicatrización y queloides suelen ser también comunes. A diferencia de en la UCMD, no suelen aparecer signos de hiperlaxitud y tampoco insuficiencia respiratoria.

Existen fenotípicos clínicos intermedios a UCMD y BM.



**Figura 6: Características clínicas frecuentes en las miopatías relacionadas con colágeno VI.** En la imagen (A) podemos observar el fenómeno de hiperlaxitud en los dedos de la mano en pacientes UCMD, mientras que la imagen (B) muestra un paciente UCMD afectado de escoliosis. Las contracturas en codos es un rasgo común en pacientes BM (C) y finalmente en la imagen (D) se detallan lesiones cutáneas en forma de queloides en una paciente UCMD. Imágenes obtenidas de (Yonekawa et al., 2015b), (Allamand, 2011), (Bönnemann, 2011) y (Bushby, 2014).

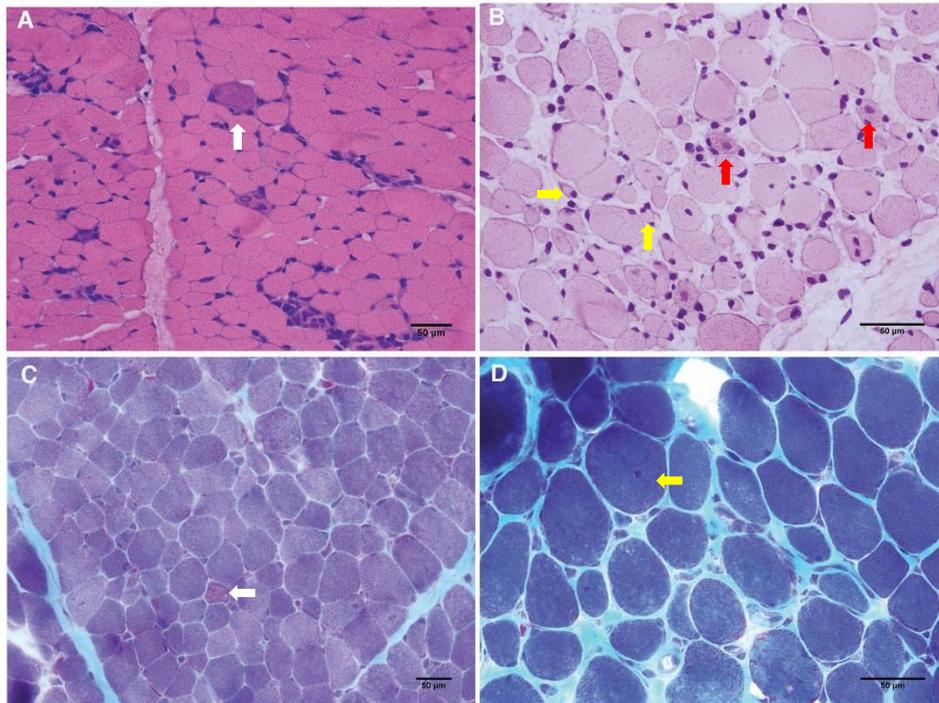
### 1.3.3 Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la evaluación detallada de los signos clínicos en combinación con distintas técnicas diagnósticas las que ayudaran al correcto diagnóstico diferencial.

#### 1.3.3.1 Diagnóstico patológico y bioquímico

Una de las principales herramientas de diagnóstico es el estudio anatomopatológico de la biopsia muscular de pacientes.

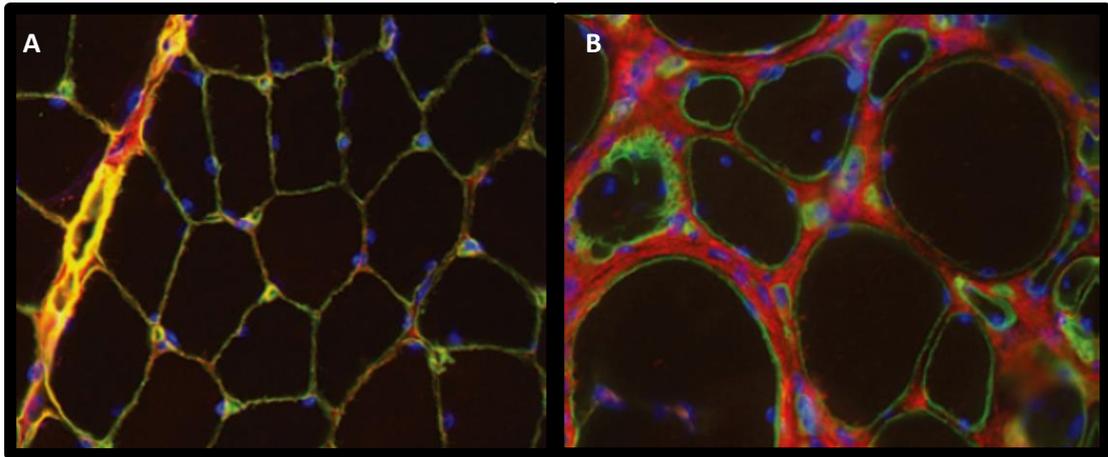
Los cambios observados a este nivel histopatológico varían entre pacientes, pero algunos hallazgos frecuentes son la variabilidad en el diámetro de las fibras musculares con presencia de fibras atroficas (Schessl et al., 2008) (Paco et al., 2012) y la proliferación de tejido conectivo endomisial y de tejido adiposo endo- y perimisial. También pueden encontrarse en una proporción variable fibras regenerativas y signos de inflamación (Paco et al., 2013).



**Figura 7: Cambios morfológicos en biopsias musculares de pacientes UCMD.** Las imágenes **A** y **B** corresponden a tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) de dos pacientes distintos y las imágenes **C** y **D**, a tinciones de tricómico de Gomori modificado de otros dos pacientes más. Los pacientes de las figuras **A** y **C** muestran una estructura relativamente preservada de los fascículos musculares con un tamaño de fibras variable y fibras regenerativas aisladas (flechas blancas), mientras que los pacientes de las imágenes **B** y **D** muestran un patrón más distrófico con fibrosis (en azul claro figura **D**), fibras atróficas (flechas amarillas) y fibras regenerativas con núcleos centrales (flechas rojas). Barra de escala= 50µm.(Paco et al., 2012)

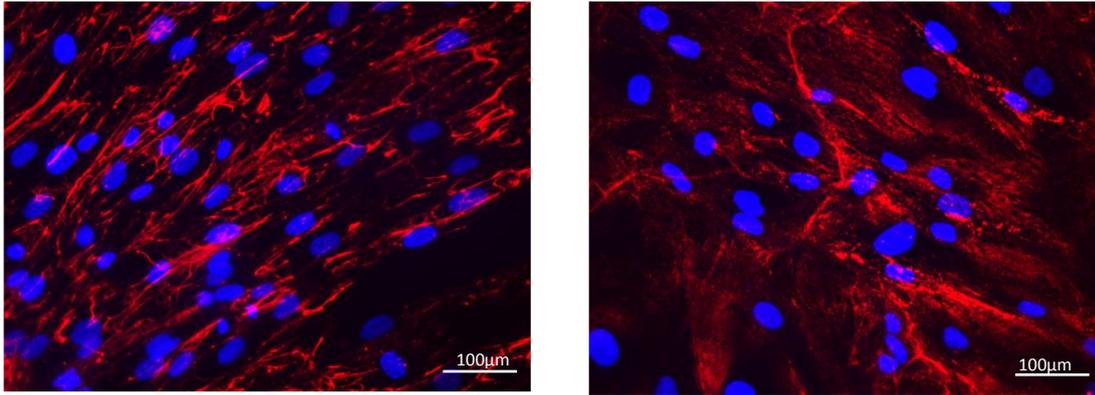
La inmunotinción de biopsias musculares con anticuerpos que reconocen el colágeno VI permite estudiar su localización. En condiciones normales el colágeno VI se localiza principalmente en la membrana basal que rodea la célula muscular, en los capilares y vasos sanguíneos, en los nervios intramusculares y en el endomisio que rodea a la célula muscular y el perimisio que rodea los fascículos musculares.

En la mayoría de los pacientes UCMD, las mutaciones en genes de colágeno VI causan una reducción parcial y localizada de colágeno VI aunque en algunos casos pueden resultar en la ausencia total de la proteína (Tagliavini et al., 2014). Para ayudar a la interpretación y descartar alteraciones secundarias de la membrana basal se suele realizar una doble inmunofluorescencia combinando anticuerpos contra colágeno VI y anticuerpos contra otra proteína de la membrana basal (perlecan o colágeno IV en general). En la gran mayoría de pacientes BM la inmunotinción de colágeno VI suele ser indistinguible del patrón de normalidad.



**Figura 8: Inmunofluorescencia en biopsias musculares de pacientes UCMD.** En rojo se marca el colágeno VI y en verde la subunidad  $\gamma$ -1 de la proteína de lámina basal laminina. La localización de ambas proteínas se puede observar en color amarillo en el control **(A)**. En el paciente **(B)** se puede observar la presencia de colágeno VI en la matriz extracelular, pero su localización alterada en la lámina basal. (Bönnemann, 2011).

Dado que el colágeno VI es sintetizado y secretado por los fibroblastos es posible estudiar la síntesis y secreción de colágeno VI en fibroblastos cultivados *in vitro* procedentes de biopsias de piel. Una vez alcanzada la confluencia del cultivo, los fibroblastos son tratados con ácido ascórbico, necesario para permitir la correcta secreción de colágeno VI y otras proteínas de la matriz extracelular. Posteriormente el colágeno VI puede detectarse mediante inmunofluorescencia o bien por otras técnicas como la citometría de flujo (Kim et al., 2012) (Jimenez-Mallebrera et al., 2006). Además de la reducción en la cantidad de colágeno VI depositada en la matriz extracelular estas técnicas permiten también detectar la acumulación de colágeno VI en el interior del fibroblasto. La sensibilidad de esta técnica en pacientes UCMD es elevada mientras que es menor en pacientes Bethlem.



**Figura 9: Inmunofluorescencia en fibroblastos en cultivo de pacientes UCMD.** En rojo se marca el colágeno VI y azul los núcleos celulares con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). En los fibroblastos del individuo control **(A)** se observa una disposición regular de las fibras de colágeno VI en la matriz extracelular. En el paciente **(B)** se puede observar una reducción de colágeno VI en la matriz extracelular, así como una desorganización de la red fibrilar. Barra de escala= 100µm

### 1.3.3.2 Resonancia magnética

La técnica de imagen por resonancia magnética (MRI, *Magnetic Resonance Imaging* en inglés) es una técnica no invasiva empleada en el diagnóstico de pacientes UCMD y BM, principalmente con el objetivo de descartar otras miopatías propuestas a partir de las características clínicas observadas en el paciente sin diagnóstico (Deconinck et al., 2010).

El patrón de afectación muscular observado en UCMD y BM es muy parecido, caracterizado principalmente por una atrofia concéntrica, es decir, existe mayor atrofia en la zona externa del músculo que en su interior.

En los pacientes BM se ven afectados principalmente en los músculos vasto lateral y medial, mientras que los pacientes UCMD muestran una afectación más difusa de los músculos del muslo. En los pacientes BM existe una atrofia central originada alrededor de la fascia central que se extiende hasta el interior del músculo.

En ambos grupos se observa de manera parecida el patrón de atrofia concéntrica en los músculos gastrocnemio medial y sóleo (Eugenio Mercuri et al., 2005)(Díaz-Manera et al., 2015).

### 1.3.3.3 Diagnóstico genético

El estudio genético es imprescindible no solo para el diagnóstico preciso del paciente sino también, para predecir la evolución de la enfermedad (Deconinck et al. 2014) y para el tratamiento futuro con terapias específicas para cada tipo de mutación (por ejemplo aquellas orientadas a reducir la expresión del alelo portador de una mutación dominante) (Bolduc et al., 2014). Y finalmente, para proporcionar un correcto consejo genético a los progenitores cuando estos son portadores asintomáticos.

La técnica más empleada es la secuenciación directa, por el método de Sanger (Sanger et al., 1977) de las regiones codificantes procedentes de exones (108 exones entre COL6A1, COL6A2 y COL6A3) y las zonas colindantes a estos (intrones).

Durante los últimos años ha habido un gran avance en el desarrollo de la biotecnología que permite realizar estudios genéticos a gran escala, de un modo muy rápido, con una gran sensibilidad y con un menor coste. Son las llamadas técnicas de secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*) a partir de ADN genómico o bien a partir de ARN obtenido de músculo o fibroblastos.

Para el estudio de deleciones/duplicaciones y reordenamientos genéticos se puede emplear la técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) o la hibridación genómica comparativa (CGH, *Comparative Genomic Hybridization*) (Foley et al., 2011) (Bönnemann et al., 2014) (Lampe et al., 2005).

En algunas ocasiones se pueden detectar mutaciones heterocigotas de significado incierto por lo que es necesario contrastar los hallazgos con bases de datos que recogen las mutaciones previamente descritas en pacientes ([www.dmd.nl](http://www.dmd.nl) y ClinVar), bases de datos con información sobre las frecuencias de cambios heterocigotos en distintas poblaciones (por ejemplo, [exac.broadinstitute.org](http://exac.broadinstitute.org)) y herramientas bioinformáticas que permiten predecir *in silico* el impacto de una variante genética en la proteína afectada (por ejemplo, <http://www.mutationtaster.org/>). De la misma forma, es posible predecir *in silico* mediante diferentes software los efectos de ciertas mutaciones en el proceso de *splicing*.

Además hay que tener en cuenta el fenómeno del mosaicismo somático de algunas mutaciones dominantes lo que puede explicar parte de la variabilidad intrafamiliar observada en algunas familias (Donkervoort et al., 2015).

## 1.4 Vías de señalización implicadas en el control de la glucemia en músculo esquelético

Las principales vías de señalización en las que se ha puesto especial interés en este trabajo son la vía PI3K/Akt y la vía de AMPK por su participación en la captación de glucosa en el músculo esquelético. Defectos en la vía de señalización PI3K/Akt (Tremblay et al., 2001) (Karlsson et al., 2005) y en la vía de AMPK (Coughlan et al., 2014) (O'Neill, 2013) han sido relacionados con un estado de resistencia a insulina.

El principal interés de estudiar de estas vías fue su interrelación con el posible papel del colágeno VI como molécula señalizadora en un contexto de resistencia a insulina.

### 1.4.1 Vía de señalización PI3K/Akt

La proteína Akt es una quinasa serina/treonina que participa múltiples procesos celulares como son el metabolismo de la glucosa, proliferación celular, supervivencia, apoptosis y crecimiento (Manning et al., 2007).

La vía de PI3K/Akt es activada mediante el estímulo de la molécula de insulina a través del receptor de insulina IR situado en la superficie de la célula muscular. La unión de la insulina a su receptor provoca la fosforilación de residuos de tirosina que reclutaran substratos como el IRS-1 que a su vez serán reconocidos por el dominio Src de homología 2 (SH2) de la subunidad reguladora p85 de la quinasa PI3 (PI3K). La PI3K provoca el reclutamiento de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) y su fosforilación a fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). PIP3 facilitará el reclutamiento de la proteína Akt a la membrana celular. La activación de la Akt viene determinada por la fosforilación de su residuo treonina 308 (Thr<sup>308</sup>), por parte de la quinasa dependiente de fosfatidilinositol 1 (PDK1) (Alessi et al., 1997) , y de su residuo serina 473 (Ser<sup>473</sup>) por parte del mTORC2 (Sarbasov et al., 2005).

La activación de Akt promueve la captación de glucosa mediante la translocación de los receptores de glucosa (GLUT), principalmente GLUT4 (Gaster et al., 2000) (Stuart et al., 2006), a la membrana plasmática de la célula muscular. Este proceso se realiza mediante la fosforilación de TBC1D1 Y del substrato de 160kDa de Akt, AS160 y estas serán las responsables de la translocación de los receptores de glucosa la membrana celular (Saltiel et al., 2001) (Howlett et al., 2007) (Sakamoto et al., 2008) (Kane et al., 2002).

## INTRODUCCIÓN

Además de impulsar la captación de glucosa, la activación de la proteína Akt mediante un estímulo de insulina, interviene en la fosforilación e inactivación de las dos isoformas de la proteína glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3 $\alpha/\beta$ ) en sus residuos de serina 21 y 9 (Ser21/9) (Cross et al., 1995).

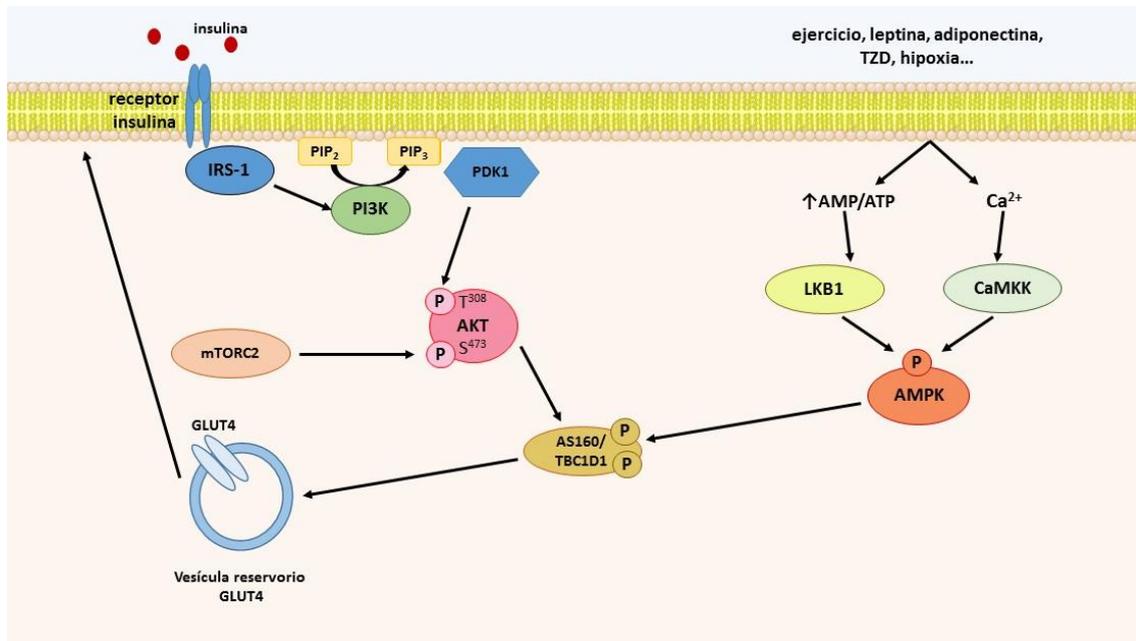
La enzima glucógeno sintasa (GS) es un sustrato de GSK3 y actúa estimulando la síntesis de glucógeno cuando se encuentra desfosforilada. La activación de GSK3 inhibe la síntesis de glucógeno mediante la fosforilación de la GS, por lo que la inactivación de GSK3 promovida por insulina resulta en el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno.

### 1.4.2 Vía de señalización AMPK

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase* en inglés) es un heterodímero con actividad quinasa serina/treonina. Está compuesto por una subunidad catalítica  $\alpha$  y las subunidades reguladoras  $\beta\gamma$ . La isoforma predominante en músculo esquelético es la  $\alpha_2$ , mientras que la  $\alpha_1$  se encuentra mayoritariamente en el tejido adiposo y hepático. En el músculo esquelético, actúa como un regulador metabólico promoviendo la captación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en condiciones de demanda energética como ocurre durante el ejercicio o la restricción calórica (O'Neill, 2013) (Chen et al., 2003). Diversos fármacos como las tiazolidinedionas (TZD) usadas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 son capaces de activar a AMPK (Fryer et al., 2002). De manera similar, hormonas endógenas pueden participar en la activación a AMPK. Entre ellas se encuentra la leptina, una adipoquina capaz de activar AMPK aumentando la ratio AMP/ATP en el músculo (Minokoshi et al., 2002) y la adiponectina, que media la activación de AMPK a través de su unión al receptor de adiponectina R1 (Zhou et al., 2009).

La activación de la vía mediante la fosforilación de AMPK requiere por un lado, el aumento de la AMP intracelular y por otro, la fosforilación del residuo treonina de la subunidad  $\alpha$  de AMPK (Thr<sup>172</sup>) (Sanders et al., 2007) (Oakhill et al., 2011). Las quinasa encargadas de llevar a cabo esta fosforilación son la quinasa B1 (LKB1) (Sakamoto et al., 2005), la quinasa CaMKII $\beta$  (*calcium-dependent calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase*, en inglés) regulada por los niveles de calcio intracelulares (Hawley et al., 2005) y finalmente, la quinasa TAK1 (*transforming growth factor- $\beta$  activated protein kinase-1*, en inglés) (Momcilovic et al., 2006).

La proteína AMPK activada, fosforila a AS160 y TBC1D1 de la misma manera que Akt, con el resultado de una translocación de GLUT4 a la membrana de la célula esquelética aumentando la entrada de glucosa (Sakamoto et al., 2008) (Jessen et al., 2011).



**Figura 10: Vías de señalización implicadas en la captación de glucosa a través de la translocación de GLUT4.** La insulina estimula Akt que fosforila sus sustratos AS160 and TBC1D1 en sus residuos Thr<sup>642</sup> y Thr<sup>596</sup>, respectivamente. Resultando en la translocación de vesículas GLUT4 a la membrana plasmática. La contracción a través de déficit de energía (relación elevada AMP/ATP) y niveles de calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular elevados conducen a la activación de la AMPK a través de LKB1 y quinasa CaMKK. Esto conlleva a la fosforilación de AS160 y TBC1D1 regulando la translocación de vesículas con GLUT4 a la membrana plasmática. Imagen adaptada de (Sakamoto, 2008)



## **2 OBJETIVOS**

---



En vista de los múltiples procesos en los que se ve involucrado el colágeno VI, tanto en la célula adiposa como muscular, y sobre la base de como alteraciones en su expresión en modelos animales producen profundos cambios a nivel metabólico, se convierte en un objetivo clave la identificación de su papel en la regulación metabólica así como la relación de este con la fisiopatología de las miopatías relacionadas con déficits en colágeno VI.

Por tanto, los objetivos concretos de este trabajo han sido los siguientes:

1. Investigar el efecto de colágeno VI en la homeostasis de la glucosa y definir el mecanismo subyacente *in vitro* en las células musculares y adipocitos.
2. Describir la cantidad y el patrón de distribución de tejido adiposo y de tejido magro en pacientes con UCMD y BM en relación a una población sana y a otras formas de distrofia muscular.
3. Correlacionar el anterior objetivo con los hallazgos clínicos (gravedad de la enfermedad y función motora) y los parámetros bioquímicos (niveles de adipoquinas) de los pacientes estudiados.



## **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

---



### 3.1 Cultivos de líneas celulares

#### 3.1.1 Cultivos LHCN-M2

Las células LHCN-M2 son una línea celular muscular derivada de células satélite aisladas del músculo pectoral mayor de un varón caucásico de 41 años (Zhu et al., 2007). El uso de esta línea en el presente estudio fue gracias a la donación por parte del Dr. Woodring Wright (University of Texas Southwestern Medical Center). La principal característica de esta línea celular es su capacidad proliferativa ilimitada conservando a la vez una capacidad de diferenciación a miotubos correcta.

Los mioblastos LHCN-M2 se cultivaron en placas de cultivo 100x20mm en Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, glucosa 4500 mg/l) suplementado con 2mM de L-glutamina, MEM199, 15% de suero fetal bovino (FBS), 0,016M HEPES, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 41,7 µg/ml fungisona, 0,03 mg/ml de ZnSO<sub>4</sub>, 1,4 mg/ml de vitamina B12, 0,055 g/ml de dexametasona, 2,5 ng/ml de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor de 2,5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Cuando las células alcanzaban el 70% de confluencia se cambiaban a medio de diferenciación compuesto por DMEM (4500 mg de glucosa/l), MEM199, 0,5% de FBS, 0,02M HEPES, 10 mg/ml de insulina, 100 mg/ml de apo-transferrina, 0,055 g/ml dexametasona y 100 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomycin y 41,7 mg/ml fungisona durante 2 días. La diferenciación se completó con medio de diferenciación sin insulina y sin apo-transferrina hasta el día 7. Tanto el medio de crecimiento como el de diferenciación se renovaron cada dos días.

#### 3.1.2 Cultivos C2CC12

La línea C2C12 es una línea celular muscular derivada de mioblastos de ratón de la cepa C3H. Se crecieron en placas de 6 pocillos en DMEM con 4500 mg/l de glucosa suplementado con 2mM de L-glutamina, 10% FBS, 100 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomycin y 41,7 mg/ml de fungisona. Este medio se cambió cada dos días y se dejó que las células alcanzaran la confluencia. A continuación, se diferenciaron a miotubos sustituyendo el medio de crecimiento por medio de diferenciación compuesto de DMEM con 4500 mg/l de glucosa suplementado con 2% de suero de caballo (HS) y 100 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomycin y 41,7 mg/ml de fungisona durante 4 días, renovando el medio cada día.

### 3.1.3 Cultivos L6E9

Como las anteriores líneas celulares, la L6E9 es una línea miogénica, en este caso de rata. Las células se crecieron en placas de 6 pocillos en medio DMEM suplementado con 2mM de L-glutamina, 25mM de hepes, un 10% de FBS, un 1% de antibióticos (100 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina) y 41,7 mg/ml de fungisona. El medio se cambió cada dos días hasta que las células alcanzaron un 80-90% de confluencia, momento en el que se diferenciaron reduciendo la concentración de FBS en el medio a un 2% hasta que se logró una completa diferenciación al cabo de cuatro días durante los cuales se cambió el medio cada día.

### 3.1.4 Cultivos 3T3-L1

Las células 3T3-L1, son una línea celular que presentan una morfología similar a los fibroblastos capaz de diferenciarse en adipocitos y que fue establecida por G. Todaro y H. Green (H. Green et al., 1975) a partir de tejido embrionario de ratón. El mantenimiento de las células sin diferenciar se realizó en placas de 6 pocillos y las células se mantuvieron en DMEM con 4500 mg/l de glucosa suplementado con 2mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino (FBS), HEPES 25 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina y 41,6 mg/ml de fungisona. El medio de crecimiento fue substituido cada dos días. Después de 48 horas tras haber alcanzado la confluencia, las células se diferenciaron a adipocitos en un medio que contuvo DMEM suplementado con 10% FBS, 500mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) y dexametasona 0,25M, HEPES 25mM, 5 mg/ml de insulina y 100 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina y 41,6 mg/ml de fungisona durante 2 días. Luego, las células se cambiaron al segundo medio de diferenciación preparado con medio DMEM (glucosa 4500mg/l) suplementado con 2mM de L-glutamina, 10% de FBS, HEPES 25mM y 5 mg/ml de insulina durante 2 días. Finalmente las células se mantuvieron en un tercer medio de diferenciación idéntico al segundo medio de diferenciación descrito, excepto por la ausencia de insulina, hasta completar 10 días desde la inducción de la diferenciación y renovando el medio cada dos días.

### 3.1.5 Cultivos SGBS

La línea celular SGBS es una línea de preadipocitos humanos de origen subcutáneo (Fischer-Posovszky et al., 2008) que fue proporcionada por el Dr. Martin Wabitsch (Universidad de Ulm, Alemania). Los preadipocitos se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) suplementado con 33 $\mu$ M de biotina y 17 $\mu$ M de pantotenato más un 10% de FBS. Los preadipocitos SGBS confluentes (día 0) se indujeron para diferenciar a

adipocitos utilizando DMEM/F-12 suplementado con 33βM de biotina, 17μM de pantotenato, 0,01 mg/ml de transferrina, 20nM de insulina, 0,1μM cortisol, 0,2nM de triyodotironina, 0,5mM IBMX, 2μM derosigitazona y 25nM de dexametasona durante 4 días y luego en el mismo medio carente de IBMX, rosiglitazona y dexametasona para un máximo de 10 días más (día 14).

Los subcultivos celulares se realizaron al alcanzar un 70-80% de confluencia máxima para las cinco líneas descritas usando una solución al 0,17% en PBS de la enzima proteolítica tripsina. El conteo de la suspensión celular obtenida tras la tripsinización de las células de la placa de cultivo se realizó manualmente en el microscopio óptico con la ayuda de la cámara de *Neubauer*. La concentración de células sembradas en los sucesivos subcultivos fue de 100.000 células en una placa de 100mm, 50.000 células por pocillo en las placas de 6 pocillos y 15.000 células por pocillo en las placas de 96 pocillos. Las células destinadas a la congelación para el mantenimiento del *stock* se criopreservaron a -80°C durante 24 horas y posteriormente en nitrógeno líquido a una concentración entre 1 y 2 millones por mililitro en FBS con un 10% de DMSO (dimetilsulfóxido). Las células en cultivo se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Todos los reactivos para los cultivos celulares, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.).

### 3.2 Pacientes

En esta tesis se incluyeron pacientes pertenecientes a tres grupos de distrofias musculares: niños con distrofia muscular congénita Ullrich (UCMD), niños con distrofia muscular de Duchenne (DMD) y adultos con miopatía de Bethlem (BM). Todos los pacientes incluidos en el estudio tenían un diagnóstico confirmado genéticamente. Un grupo de niños sanos y un grupo de adultos sanos, emparejados por edad y sexo, sin patología metabólica o endocrina sirvieron como controles. Los pacientes y controles incluidos para cada técnica se detallan en los correspondientes apartados de la sección de “Materiales y métodos”. Todos los participantes fueron reclutados en el Hospital Sant Joan de Déu (Esplugues de Llobregat) en el caso de los niños o, en el caso de los adultos, en el Hospital Universitario de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat), y el Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu (Barcelona), en colaboración con Dra. Montserrat Olivé (Unidad Neuropatología) y el Dr. Jordi Díaz Manera (Unidad de Neurología). Para la participación en el estudio, se obtuvo consentimiento informado para la investigación por escrito de todos los pacientes (o sus padres/tutores) de acuerdo con las formas y los reglamentos del Hospital Sant Joan de Déu. La información clínica sobre los pacientes se detalla la **Tabla 2** localizada en el anexo.

### 3.3 Muestras de tejido humano

#### 3.3.1 Muestras de músculo

Las muestras de músculo usadas en esta tesis se obtuvieron a través del Biobanc de l'Hospital Infantil San Joan de Déu per a la Recerca (BHISJDI). Las muestras pertenecientes a pacientes procedían de biopsias musculares congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras de músculo de controles se obtuvieron de niños no afectados por ninguna enfermedad neuromuscular durante el proceso de cirugía ortopédica en el Hospital San Joan de Déu.

MUESTRA	DIAGNÓSTICO	EXPRESIÓN DE COLÁGENO VI EN MÚSCULO	SEXO	EDAD BIOPSIA
1	UCMD	Déficit parcial	F	3 años
2	UCMD	Déficit parcial	F	1,5 años
3	UCMD	Déficit parcial	M	3 años
4	UCMD	Ausente	M	1 años
5	UCMD	Déficit parcial	M	4 años
6	UCMD	Déficit parcial	M	7 años
7	CONTROL	-	M	2 años
8	CONTROL	-	F	13 años
9	CONTROL	-	M	18 años
10	CONTROL	-	F	15 años
11	CONTROL	-	M	4 años
12	CONTROL	-	M	8 años

**Tabla 3: Información de los pacientes donantes de biopsia de músculo esquelético.** La mayoría de las biopsias musculares fueron obtenidas de los músculos cuádriceps.

#### 3.3.2 Muestras de sangre

Las muestras de sangre total de los pacientes se recogieron en el servicio de Diagnóstico de laboratorio del Hospital Sant Joan de Déu en tubos VACUETTE® (VWR, Barcelona, España) tratados con anticoagulante EDTA. Con tal de descartar las células presentes en la muestra, se realizó una centrifugación a 1500g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante que correspondía a la fracción de suero. Las muestras con signos de hemolisis fueron descartadas. Las muestras de suero se alíquotaron en volúmenes de 300µl en tubos Wilmut codificados con un código de barras único para cada muestra y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el Biobanco del Hospital Infantil Sant Joan de Déu para la investigación (BHISJDI) hasta su uso.

### 3.4 Tratamientos celulares

#### 3.4.1 Tratamiento para estudios de inhibición de ILK

Los estudios de inhibición de la quinasa ligada a integrina (ILK) se realizaron en células C2C12 diferenciadas durante cuatro días en placas de seis pocillos. El cuarto día de diferenciación, se retiró el medio a las células y se lavaron con PBS para seguidamente añadir medio de depleción compuesto por DMEM y 2mM de L-glutamina al que se le añadieron 2 $\mu$ M del compuesto 22 (Cpd22), inhibidor específico de la ILK. Transcurridas 6 horas, se añadieron 5mg/l de colágeno VI soluble en el mismo medio y se continuaron ambos tratamientos durante toda la noche hasta completar las 24 horas de tratamiento con Cpd22. Finalmente se realizó la extracción de proteína.

#### 3.4.2 Tratamiento para estudios de señalización de colágeno VI

Para los estudios de las posibles vías de señalización que mediaban el efecto del colágeno VI se utilizaron células C2C12 diferenciadas durante cuatro días y 3T3-L1 diferenciadas durante diez días en placas de seis pocillos tal y como se describe en el apartado 3.1 de Materiales y métodos. Una vez diferenciadas, se retiró el medio a las células y se lavaron con PBS. A continuación se añadió medio de depleción (DMEM + 2Mm de L-glutamina). Al cabo de seis horas, se añadieron en el mismo medio de depleción 5mg/l de colágeno VI soluble durante 16 horas. Una vez completadas las 16 horas se añadieron 100nM de insulina durante 20 minutos o 1mM de AICAR durante 15 minutos y se procedió a la extracción de proteína.

### 3.5 Técnicas de obtención, determinación y análisis de proteína

#### 3.5.1 Obtención de extractos celulares totales

Una vez transcurridos los tiempos de tratamiento necesarios, las células en cultivo diferenciadas se lavaron en hielo con PBS y se lisaron añadiendo 75-100 $\mu$ l de tampón de lisis compuesto por Tris 50mM (pH7.45), NaCl 151mM, EDTA 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaF 5mM, Triton 1% (todos los reactivos de Sigma-Aldrich) y un coctel inhibidor de proteasas (Roche, Basel, Switzerland) a una dilución 1:100. Las placas de células con el tampón de lisis añadido se dejaron en hielo durante 10 minutos y se prosiguió a raspar las monocapas celulares con un *scraper*. El homogenizado

## MATERIALES Y MÉTODOS

se traspasó a un eppendorf y se centrifugó a 16500g a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se determinó la concentración de proteína.

### 3.5.2 Obtención de fracción membrana plasmática de extractos celulares

Una vez realizados los tratamientos necesarios para cada estudio en las células diferenciadas, estas se lavaron en hielo con PBS y se lisaron añadiendo 200µl de tampón de homogenización [HEPES 20mM, EDTA 1mM, sacarosa 225mM (todos los reactivos de Sigma-Aldrich) y un coctel inhibidor de proteasas (Roche, Basel, Switzerland) a una dilución 1:10] por pocillo. Las placas de células con el tampón de lisis añadido se dejaron en hielo durante 10 minutos y se rasparon con un *scraper*. El lisado se pasó a través de una jeringuilla de 1ml con una aguja de 25G y se centrifugó a 7000g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 150000g durante 1 hora y 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante de esta segunda centrifugación y el pellet resultante se resuspendió en 100µl de HEPES 30mM y se cuantificó para determinar la concentración de proteína.

### 3.5.3 Obtención de extractos de músculo

Para la obtención de extractos de tejido muscular se partió de piezas de 30-50mg congeladas a -80°C de biopsias musculares de 6 pacientes UCMD y 6 controles (**Tabla 3**). Las piezas congeladas se homogenizaron en 200µL de tampón de homogenización [(75 mM Tris-HCl pH 6,8; 1% SDS; 10mM NaF; 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y coctel inhibidor de proteasas (Roche, Basel, Switzerland) a una dilución 1:10] con la ayuda de un *TissueRuptor* (Qiagen, Hilden, Alemania). A continuación las muestras homogenizadas se hirvieron durante 5 minutos a 95°C y se centrifugaron a 19000g a 4°C durante 20 minutos y se recogió el sobrenadante.

### 3.5.4 Determinación de la concentración de extractos de proteína

La cuantificación de los extractos de proteína tanto total como de fracción de membrana se realizaron usando el kit comercial *BCA protein assay kit* (Pierce, Rockford, USA) basado en el método del ácido bicinonínico (BCA). El protocolo seguido es el indicado en las instrucciones del kit. Brevemente, en primer lugar se diluyeron en H<sub>2</sub>O destilada las muestras de proteína, 20 veces para los extractos celulares y 40 veces para los extractos de biopsia. Se cargaron 25µl de muestra diluida por duplicado en una placa de 96 pocillos. Así mismo, se añadieron 25µl por duplicado de concentraciones crecientes de suero bovino (BSA) (0; 25; 125; 250; 500; 750; 1000 y 2000 µg/ml) preparadas en H<sub>2</sub>O destilada que sirvieron como recta patrón para extrapolar la

concentración de nuestras muestras. A continuación se añadieron 200µl por pocillo del reactivo de trabajo compuesto por el reactivo A y el reactivo B (50:1). Se dejó la placa durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se leyó la absorbancia a 540nm en el lector de placas EMax® (Molecular Devices, Sunnyvale, EE.UU.)

### 3.5.5 Análisis de proteínas por Western Blot (WB)

La detección y cuantificación de proteínas en extractos celulares totales y de membrana plasmática así como homogenados de tejido muscular se realizó mediante la técnica Western blot (WB).

Las muestras de proteína fueron desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos en un tampón de carga (170,45M Tris; 27,27% glicerol; 5,45% SDS y 0,27µg/ml de azul de bromofenol) en una proporción de 1 parte de tampón de carga por dos partes de proteína solubilizada. Se cargaron 20-30µg del extracto desnaturalizado en un gel de poliacrilamida *Mini-PROTEAN® TGX™* gels (Bio-Rad, Hercules, California) al 10% para las proteínas de peso intermedio y con gradiente de 4-15% para las proteínas de alto peso molecular. Las proteínas desnaturalizadas se separaron en el gel según su tamaño mediante un sistema de electroforesis *Mini-PROTEAN® Tetra cell* (Bio-Rad, Hercules, California) en una cubeta con 700ml de tampón de electroforesis (0,25mM de Tris + 2mM de Glicina y 0,1% SDS) y conectado a una fuente de alimentación EV243 (Consort, Turnhout, Bélgica).

Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa *Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Pack* usando el sistema *Tans-Blot® Turbo™ Transfer System* (BioRad, Richmond, USA) con un programa de 7 minutos a 1,3A y 25V para los geles al 10% de acrilamida y de 10 minutos a 1,3A y 25V para los geles de gradiente 4-15%. Una vez finalizada la transferencia de las proteínas, se tiñó la membrana con una tinción Ponceau (2% de ácido acético y 0,1gr/ml de ponceau en H<sub>2</sub>O destilada) para evaluar la correcta transferencia de las proteínas del gel a la membrana. Así mismo, para evaluar las proteínas no transferidas a la membrana, se tiñó el gel con una tinción Comassie (10% de ácido acético, 40% de isopropanol y 0,2gr/ml de comassie). La membrana se lavó con TBS-Tween 0,1% para eliminar los restos de Ponceau. A continuación se bloqueó con un 5% de leche desnatada en polvo o un 2% de BSA en TBS-Tween 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Después del bloqueo se incubó la membrana con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C.

Anticuerpo	Antígeno	Reactividad	Dilución	Casa Comercial
<b>anti-Phospho-Akt</b>	Akt fosforilada en residuo Ser472	Conejo	1:1000	Cell Signalling
<b>anti-Akt</b>	Niveles totales de Akt1, Akt2 and Akt3	Conejo	1:1000	Cell Signalling
<b>anti-Phospho AMPK</b>	AMPK fosforilada en residuo Thr172	Conejo	1:1000	Cell Signalling
<b>anti-AMPK<math>\alpha</math></b>	Niveles totales de AMPK $\alpha$	Conejo	1:1000	Cell Signalling
<b>anti-AS160</b>	AS160 fosforilada en residuo Thr642	Conejo	1:1000	Cell Signalling
<b>anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase</b>	Niveles totales de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa	Conejo	1:10000	Abcam
<b>anti-Phospho GSK3<math>\alpha\beta</math></b>	GSK3 $\alpha\beta$ fosforilada en residuo Ser21/9	Conejo	1:500	Cell Signalling
<b>anti-GSK3<math>\alpha\beta</math></b>	Niveles totales de GSK3 $\alpha\beta$	Conejo	1:500	Millipore
<b>anti-GLUT4</b>	Extremo C-terminal de GLUT4	Conejo	1:1000	Millipore
<b>anti-GLUT1</b>	Extremo C-terminal de GLUT1	Conejo	1:500	Abcam
<b>anti-<math>\alpha</math>-Tubulin</b>	Niveles totales de $\alpha$ -Tubulin	Ratón	1:50000	Sigma-Aldrich
<b>anti-Phospho Glycogen Synthase</b>	Glucógeno sintasa fosforilado en residuo Ser641	Conejo	1:1000	Cell Signalling
<b>anti-Glycogen Synthase</b>	Niveles totales de glucógeno sintasa	Conejo	1:1000	Cell Signalling
<b>GAPDH</b>	Niveles totales de GAPDH	Conejo	1:1000	Cell Signalling

**Tabla 4: Anticuerpos primarios usados en *Western Blot*.**

El día siguiente se realizaron tres lavados de 10 minutos y se incubó la membrana con una dilución 1:10000 de anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa contra conejo o contra ratón (Jackson Immuno Research). La detección del anticuerpo secundario se realizó mediante autoradiografía usando el sustrato *enhanced chemiluminescence* (ECL) (Pierce, Rockford, USA). El contenido de proteína se expresó en unidades arbitrarias en relación a los controles de carga  $\alpha$ -tubulina (Sigma, Missouri, USA) o GAPDH (Cell Signaling, UK).

La intensidad de las bandas de proteína de las imágenes escaneadas se determinaron mediante densitometría con el programa ImageJ.

Las reincubaciones de las membranas con un nuevo anticuerpo primario de peso molecular similar al primer anticuerpo detectado se realizaron después de la eliminación de los anticuerpos primario y secundario mediante un proceso de lavado de la membrana durante 30 minutos a 56°C y agitación suave en una solución de Tris-HCl 50mM de pH 6,8; 2%SDS y 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol. Transcurridos los 30 minutos la membrana se lavó para eliminar los restos de la solución y se continuó el proceso de bloqueo e incubación específico para cada anticuerpo.

### 3.5.6 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* en inglés) se usó para la detección de adipoquinas en muestras de suero de pacientes con mutaciones en uno de los tres genes codificantes para colágeno VI, pacientes con DMD y controles proporcionadas por el Biobanc de l'Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la recerca (BHISJDI).

Los niveles de adiponectina de alto peso molecular (HMW adiponectina), leptina y de la proteína de unión al retinol 4 (RBP4) en suero se midieron usando los kits comerciales de ELISA #EZHMWA-64K, #EZHL-80SK (Millipore, Temecula, CA, EE.UU.) y DRB400 (R&D systems, Minneapolis, EE.UU.) respectivamente. Las muestras usadas para el estudio de adiponectina de alto peso molecular fueron sometidas a digestión previa al ensayo de ELISA con el objetivo de obtener la molecular de adiponectina de alto peso molecular y desechar las otras formas de la proteína. Los ensayos de ELISA se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante mediante los cuales cada muestra se analizó por duplicado en una placa de 96 pocillos. Brevemente, se añadieron las muestras de suero y diluciones conocidas de la adipoquina a estudiar en las placas recubiertas con un anticuerpo capaz de reconocer y atrapar la adipoquina estudiada, a continuación se lavaron los pocillos y se añadió un anticuerpo secundario biotinilado contra la adipoquina y se volvió a lavar. En el caso del ensayo contra RBP4, se trató de una detección directa por lo que este paso no se realizó y se pasó directamente al siguiente paso. Seguidamente, se añadió una estreptavidina conjugada con peroxidasa, se lavaron los pocillos y finalmente se detectó la absorbancia producida por la actividad peroxidasa en presencia del substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina a 450nm en el lector de placas EMax® (Molecular Devices, Sunnyvale, EE.UU.). Los valores se compararon con la curva estándar y se determinó la concentración.

## 3.6 Obtención, detección y análisis de RNA

### 3.6.1 Obtención de RNA de cultivos celulares

Una vez realizados los tratamientos necesarios en las células diferenciadas, y consecutivo a la extracción de proteína, se tripsinizaron las células destinadas a la extracción de RNA usando una solución al 0,17% en PBS de la enzima tripsina. El volumen de la suspensión celular obtenido se diluyó con un volumen equivalente de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) y se centrifugó a 400g durante 4 minutos. El pellet resultante se resuspendió con 1mL de PBS y se aisló el ARN

## MATERIALES Y MÉTODOS

total siguiendo las instrucciones del kit comercial *RNeasy Fibrous Tissue mini kit* (Qiagen, Hilden, Alemania).

El protocolo se basa en el uso de unas columnas que integran una membrana de sílice que selectivamente retiene el ARN y ADN presente en la muestra. Primeramente se realiza el lisado celular mediante un tampón de iocianato de guanidina capaz de desnaturalizar las proteínas presentes en la muestra así como las enzimas RNasa y DNasa inactivándolas e impidiendo su acción en la degradación del ARN y ADN. A continuación el lisado se homogeniza con la ayuda de un jeringuilla de 25G, se le añade etanol al 75% y se transfiere a la columna donde el ARN precipitará en la membrana de sílice gracias al etanol y quedará separado de los restos de proteínas que permanecen solubles a este porcentaje de etanol. Se somete la muestra a una serie de lavados y centrifugados para eliminar todo aquello que no sea ARN que pueda quedar en la muestra. Los restos de ADN que pueden permanecer presentes en la muestra se eliminan aplicando un tratamiento con enzima DNasa. Se continúan los lavados y centrifugaciones indicadas en el kit y finalmente se eluye el ARN total en 30 $\mu$ l de agua libre de RNasa.

### 3.6.2 Determinación de la cantidad y calidad del ARN

La cantidad y calidad de ARN obtenido se comprobó con un espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Schwerte, Alemania). La absorbancia máxima de los ácidos nucleicos que forman el ARN es de 260nm, mientras que en las proteínas es de 280nm por lo que el cálculo de las ratios entre estas dos longitudes de ondas se usa para conocer la pureza de la muestra (Wilfinger et al., 1997). En todas las muestras de ARN se evaluaron los siguientes índices:

- Índice 260/280: indica la pureza del ARN cuando es cercana a 2. Cuando es inferior a este valor nos indica contaminación por proteínas u otros contaminantes que absorben cerca de 280nm.
- Índice 260/230: se trata de una segunda medición de la pureza del ARN y debe encontrarse entre 2 y 2,2. Cuando es baja nos indica la presencia de contaminantes que absorben a 230nm o menos.

En todas las muestras de RNA usadas en los estudios de esta tesis, la relación 268/280 fue cercana a 2,0 y de entre 2 y 2,2 en el caso del índice 260/230.

### 3.6.3 Obtención ARN complementario

Una vez cuantificado y analizada su calidad, el ARN fue retro-transcrito a ADN complementario (ADNc). Para ello se partió de 1µg de ARN siempre que fue posible y se usó como cebador (o *primer* en inglés) el ADN sintético Oligo dT y una enzima con actividad transcriptasa inversa (Promega, Wisconsin, EE.UU.).

La combinación de cebador, enzima y ARN fue preparada siguiendo las proporciones indicadas en la **Tabla 5** y se procedió a la síntesis de ADNc con el sistemaDNA Engine® Peltier Thermal.

Componente	Volumen final
Oligo dT	1µl
Enzima Transcriptasa inversa	1µl
ARN	máximo 5µl
H <sub>2</sub> O libre de ARNasa	ajustar volumen
	7µl FINALES

**Tabla 5: Volúmenes de los componentes usados para la obtención de cDNA.**

### 3.6.4 PCR en tiempo real

La amplificación y cuantificación del ADNc se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante con *Taqman Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, California, USA), solución que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción y dónde se añadió el ADNc y las sondas específicas de *TaqMan® Gene Expression probes* (Applied Biosystems, California, USA) para cada gen que se quiso estudiar:

Gen	Referencia	Localización	Longitud amplicón	Especie
<b>AKT1</b>	Hs00178289_m1	Exones 4-5 y 5-6	66	Humano
<b>GSK3B</b>	Hs01047719_m1	Exones 1-2	65	Humano
<b>HPRT1</b>	Hs02800695_m1	Exón 2-3	82	Humano
<b>ILK</b>	Hs01101168_g1	Exones 3-4 y 4-5	75	Humano
<b>SLC2A1</b>	Hs00892681_m1	Exones 8-9	76	Humano
<b>TBP</b>	Hs99999910_m1	Exones 5-5; 6-6 y 7-7	127	Humano
<b>Akt1</b>	Mm01331626_m1	Exón 2-3	69	Ratón
<b>Cox11</b>	Mm01615963_g1	Exón 2-3	106	Ratón
<b>Cox6a2</b>	Mm00438295_g1	Exón 2-3	86	Ratón
<b>Gsk3b</b>	Mm00444911_m1	Exón 8-9	72	Ratón
<b>Hprt1</b>	Mm01545399_m1	Exón 2-3	81	Ratón
<b>Ilk</b>	Mm01274281_g1	Exón 2-3	90	Ratón
<b>Mrps27</b>	Mm00620511_m1	Exón 2-3	116	Ratón
<b>Ndufa11</b>	Mm01236867_g1	Exón 1-2	67	Ratón
<b>Ndufaf2</b>	Mm01296088_m1	Exón 2-3	73	Ratón
<b>Slc2a1</b>	Mm00441480_m1	Exón 8-9	73	Ratón
<b>Tbp</b>	Mm00446971_m1	Exón 2-3	93	Ratón

**Tabla 6: Sondas comerciales usadas para la PCR en tiempo real.** En la tercera columna se especifica la ubicación de la sonda en la secuencia de ADN anotada en la base de datos *NCBI Reference Sequence Database*.

La PCR en tiempo real se realizó en un sistema *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los valores de expresión de cada gen se calcularon en relación al gen constitutivo ( $\Delta C_t$  tratado o control =  $C_t$  gen -  $C_t$  gen constitutivo). El análisis de los resultados se realizó mediante el cálculo de la expresión relativa  $\Delta\Delta C_t$  ( $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$  tratado -  $\Delta C_t$  control) y se representó como la media de los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  o  $-1/2^{-\Delta\Delta C_t}$  en relación con los controles. Un factor de cambio por encima o por debajo de 1,5 se consideró significativo.

### 3.6.5 Microarray y análisis de datos

Para el estudio de expresión génica mediante microarrays se emplearon miotubos C2C12 tratados durante 16 horas con o sin 5 mg/L de colágeno soluble VI purificado a partir de placenta humana. En total se trabajó con 3 muestras tratadas con colágeno VI y tres sin tratar. El ARN se aisló a partir de cultivos celulares con el kit comercial *RNeasy Fibrous Tissue mini kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) tal y como se describe en el apartado 3.6.1 de Materiales y métodos.

Los siguientes pasos del protocolo fueron realizados por la Plataforma de Genómica Funcional del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS, Barcelona).

A partir de 150ng de ARN total y a través de una reacción de transcripción inversa (RT), se sintetizó la primera cadena de ADNc, que consecutivamente se convirtió en ADNc de doble cadena. Este ADNc de doble cadena se utilizó como molde para la transcripción, a través del cual se sintetizó el ARNc. El ARNc se purificó mediante perlas magnéticas, y se analizó cuantitativamente con el espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Schwerte, Alemania) y cualitativamente por Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). En todas las muestras los números de la integridad del ARN (RIN) fueron superiores a 9.1 y la ratio 260/280 cercana a 2,0. A partir del ARNc purificado, se llevó a cabo el segundo ciclo de la síntesis ADNc (mediante RP), seguido de hidrólisis por la RNasa H. El ADNc resultante se purificó por perlas magnéticas y se analizó cuantitativamente (por Nanodrop) y cualitativamente (por Bioanalyzer). Por último, la hebra de ADNc se fragmentó y se marcó con biotina para la hibridación con los oligonucleótidos del chip de microarray GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array, el cual cubre 35.240 transcritos. La hibridación se realizó a 45°C durante 16h-18h y una vez completado, el lavado y el procesamiento del chip de microarray se realizó con la Estación Fluídica de Affymetrix. Por último, el microarray fue escaneado, visualizado a través de un ordenador y analizado mediante software para comprobar que se hubieran pasado todos los controles de calidad.

El análisis del GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array de seis muestras (tres controles y tres muestras tratadas colágeno VI) se llevó a cabo tal y como se detalla a continuación brevemente gracias a la colaboración de la Plataforma de Bioinformática del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS, Barcelona).

Primeramente se realizó a partir de los datos obtenidos una corrección de la fluorescencia de fondo para eliminar la señal no específica, asimismo se efectuó una normalización por cuantiles y una estimación de los niveles de expresión calculando la media de la fluorescencia de las distintas sondas mediante el algoritmo RMA (*Robust Multiarray Average*).

A continuación se realizó, mediante un análisis exploratorio no supervisado, un Análisis de Componentes Principales (PCA) del cuantil 95%, se calculó la distancia euclídea y se representó mediante un dendograma y se realizó un agrupamiento basado en correlaciones de Pearson y Spearman. De esta manera, se puede determinar si la variación de la expresión génica representa patrones que coincidan con los grupos de muestras ya definidos (tratadas y controles). Los genes expresados diferencialmente con significación estadística se identificaron a través del método RankProd utilizando un false discovery rate (FDR) <0,1. La normalización de

cuantiles y el posterior procesamiento de los datos se realizaron en la plataforma R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Se aplicó un análisis funcional para determinar las funciones de los genes expresados diferencialmente a través del software Ingenuity Pathway Analysis de QIAGEN (IPA®, QIAGEN Redwood City, [www.qiagen.com/ingenuity](http://www.qiagen.com/ingenuity)).

### 3.7 Estudios metabólicos en células

#### 3.7.1 Estudios de captación de glucosa

La 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) es un análogo de la glucosa capaz de ser captado por la célula y fosforilado a glucosa-6-fosfato pero que, a diferencia de la glucosa, no puede ser metabolizado a través de la vía de la glicólisis debido a la sustitución del grupo 2-hidroxilo por una molécula de hidrógeno y queda retenido dentro de la célula. Esto la convierte en una eficaz herramienta para medir la captación de glucosa en un sistema celular (Barban et al., 1961).

Para medir la absorción de 2-desoxi-D-glucosa, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos siguiendo las condiciones necesarias para cada tipo celular como se describe en el apartado 3.1 de Materiales y métodos. Una vez diferenciadas, las células fueron incubadas con DMEM deplecionado de suero durante 6 h antes de la adición del tratamiento con colágeno o endotrofina a las concentraciones y tiempos detallados en la **Tabla 7**. El tratamiento con insulina se realizó siempre consecutivamente al tratamiento con los distintos tipos de colágeno o endotrofina. Después del tratamiento con colágeno/endotrofina e insulina, las células en cultivo se lavaron tres veces en PBS que contenía  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM y 0,1% de BSA, y se añadieron finalmente 500  $\mu\text{l}$  del mismo tampón a cada pocillo. A continuación, la absorción 2-DG se midió mediante la incubación con 0,5  $\mu\text{Ci}$  de 2-desoxiglucosa- $^3\text{H}$ ] (Amersham, Reino Unido) por pocillo y 0,5 mM de 2-DG no marcada (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 6 min. Finalmente, las células se lavaron tres veces en PBS frío que contenía glucosa 50 mM y luego las células adheridas a los pocillos se lisaron en PBS que contenía 1% de SDS y la radiactividad de estas muestras se midió en 5 ml de un cóctel de centelleo (Optiphase, LKB).

Tratamiento	Origen	Cultivos Tratados	Concentración Tratamiento	Duración Tratamiento	Casa comercial
Colágeno VI	Humano	LHCN-M2 C2C12 L6E9 SGBS	0; 0,5; 1; 5 y 10mg/l	20 y 40 minutos y 2 y 16 horas	Corning
Colágeno V	Humano	LHCN-M2 C2C12 L6E9 SGBS	0; 0,5; 1; 2,5 y 5mg/l	20 y 40 minutos y 2 y 16 horas	Corning
Colágeno I	Rata	LHCN-M2 C2C12 L6E9 SGBS	0; 0,5; 2,5 y 5mg/l	20 y 40 minutos y 2 y 16 horas	Corning
Endotrofina	Humano	C2C12	1; 10 y 100ng/ml	40 minutos y 2 y 16 horas	Phoenix Pharmaceuticals
Insulina	Humano	LHCN-M2 C2C12 L6E9 SGBS	100nM	20 minutos y posterior al tratamiento con colágenos	Lilly

Tabla 7: Características de los tratamientos celulares usados para la determinación de la captación de glucosa.

### 3.7.2 Determinación de la tasa de síntesis de glucógeno

Para la determinación de tasa de síntesis de glucógeno se realizó midiendo la incorporación de [U-14C] glucosa a glicógeno.

Para ello, una vez diferenciadas las células según el protocolo indicado en el apartado 3.1 de Materiales y métodos para cada tipo celular estudiado, se deplecionaron de glucosa durante toda la noche en medio DMEM. En este mismo medio se le añadió el tratamiento con 5mg/l de colágeno VI durante toda la noche que duró la depleción. El día siguiente se substituyó el medio de depleción por DMEM con 10mM D-[U-<sup>14</sup>C]glucosa (Hart Biomedica, Madrid, España) a una concentración de (0,05mCi/μmol) (DuPont NEN). Para medir la tasa de síntesis de glucógeno, se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS. A continuación se añadieron 100μl de KOH al 30% por pocillo y se rasparon con un *scraper*. Los homogenizados se pasaron a eppendorfs y se hirvieron durante 15 min y posteriormente se centrifugaron a 5.000g durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron añadidos a papel Whatman 31ET, y el glucógeno se precipitó mediante la inmersión de los papeles en etanol al 66% a -20°C durante 15 minutos con agitación. Se realizaron dos lavados adicionales de 30 minutos con etanol al 66% a temperatura ambiente y un último lavado de pocos segundo con acetona para eliminar los restos de etanol. Los papeles

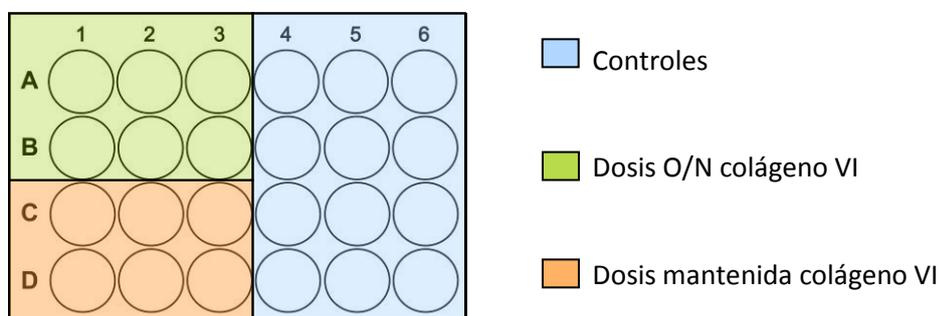
## MATERIALES Y MÉTODOS

se secaron a temperatura ambiente hasta que estuvieron totalmente secos y se introdujeron en viales con líquido de centelleo donde se midió la radiactividad.

### 3.7.3 Experimentos de respirometría

Para los estudios de respirometría se trabajó con células C2C12 que fueron sembradas a una densidad de 15.000 células/ pocillo en una placa de 24 pocillos (Seahorse Bioscience) dejando 4 pocillos libres que sirvieron como controles negativos y controles de la temperatura durante el ensayo de respirometría. Una vez confluentes las células se diferenciaron siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.1 de Materiales y métodos. El cuarto día de diferenciación los miotubos de deplecionaron con medio DMEM High Glucose suplementado con 2mM de L-Glutamina y se añadieron 5mg/l de colágeno VI soluble a los pocillos correspondientes con el que permanecieron durante toda la noche en el incubador a 37°C. Los pocillos que no fueron tratados con colágeno sirvieron como grupo control. Asimismo, durante la noche también se incubó la placa de calibración con 1ml de medio calibrador (Seahorse Bioscience) a 37°C en una estufa sin regulación del CO<sub>2</sub>.

La mañana siguiente se cambió el medio de depleción de las células por el medio del ensayo compuesto por DMEM base (Sigma) suplementado con 5,5mM de glucosa y 2 mM de L-Glutamina. Los pocillos tratados durante la noche con colágeno VI se dividieron en dos grupos, un grupo sólo sufrió el tratamiento durante la noche (O/N) con colágeno VI y el otro grupo, recibió una segunda dosis de 5mg/l de colágeno VI con el cambio de medio manteniendo el tratamiento durante todo el ensayo. Se dejó calibrar la placa durante una hora a 37°C en una estufa sin regulación del CO<sub>2</sub> con el objetivo de eliminar los protones que podrían interferir en la medida de la concentración de protones durante el ensayo.



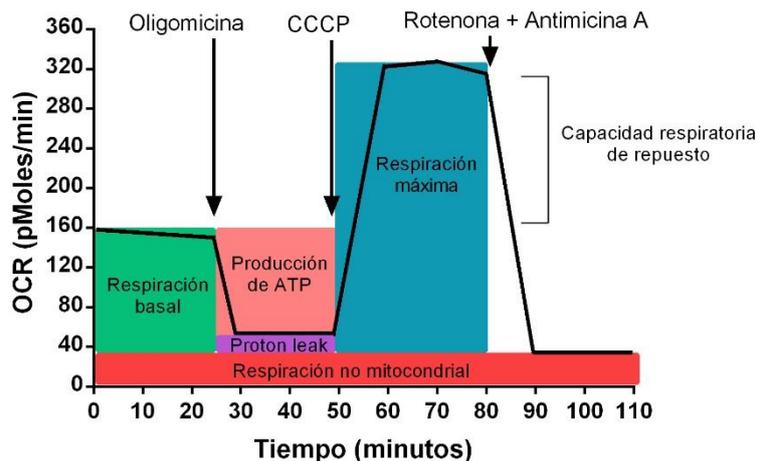
**Figura 11: Plantilla de la distribución de las distintas condiciones de tratamiento administrado a los miotubos C2C12 en la placa de 24 pocillos para la determinación del consumo de oxígeno.**

Un volumen del medio de ensayo se usó para preparar diluciones 10X de los compuestos. La placa de calibración lleva incorporado un sistema de inyección compuesto por cuatro puertos por pocillo, donde se añadieron los compuestos para ser usados a las siguientes concentraciones finales:

- Puerto A: 5 $\mu$ M de oligomicina
- Puerto B: 0.25 $\mu$ M de CCCP
- Puerto C: 0.50 $\mu$ M de CCCP
- Puerto D: 1 $\mu$ M de rotenona y 1 $\mu$ M de anticimina A

Para realizar las determinaciones de consumo de oxígeno en los miotubos C2C12, se utilizó el aparato *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience) dotado con dos sensores ópticos capaces de medir la concentración de oxígeno y de protones del medio lo que nos permite medir simultáneamente la tasa de consumo de oxígeno (OCR de *oxygen consumption rate* en inglés) y la tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR de *extracellular acidification rate* en inglés). En primer lugar se introdujo la placa de calibración con los compuestos incorporados con el objetivo de calibrar los sensores de oxígeno y pH.

Una vez acabada la calibración, se añadió la placa con los miotubos. Para determinar la tasa de consumo de oxígeno en diferentes estados respiratorios se usó un protocolo basado en la adición sucesiva de compuestos capaces de inhibir diferentes componentes de la cadena respiratoria.



**Figura 12: Perfil de los parámetros de respiración mitocondrial analizados con el *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience).** Se muestran las inyecciones secuenciales de los compuestos necesarios para obtener los valores de respiración basal, producción de ATP, *proton leak*, respiración máxima, respiración no mitocondrial y la capacidad respiratoria de repuesto. Figura adaptada de *XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide* (Seahorse Bioscience).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Primeramente se midió el consumo de oxígeno basal o de rutina (R) que nos informa de la tasa de consumo de oxígeno que realiza la célula a partir de la oxidación de los sustratos presentes en el medio de cultivo. Depende de la demanda energética en el momento preciso de la medición.

El primer compuesto añadido fue la oligomicina, un inhibidor del complejo V (ATP sintasa), que nos permite conocer la respiración que produce la célula que no va destinada a la producción de ATP llamada *proton leak* (L).

El siguiente compuesto que se añadió fue la m-clorocarbonilcianuro fenilhidrazona (CCCP), un agente desacoplador que satura el gradiente de protones produciendo un flujo constante de electrones y nos permite conocer la capacidad máxima respiratoria (E) de la célula como respuesta a una demanda energética.

Finalmente se añadieron rotenona y antimicina A, inhibidores del complejo I y II respectivamente. Inhibiendo estos dos complejos de la cadena respiratoria podemos conocer la respiración que no depende de la mitocondria que lleva a cabo la célula.

Una vez finalizado el protocolo, se lisaron las células añadiendo a cada pocillo 100µl de tampón de lisis (0,1M NaOH y 1% SDS) y se determinó la concentración de proteínas mediante el método del BCA (apartado 3.5.4 de Materiales y métodos).

La tasa de consumo de oxígeno en cada estado se expresó como pmol O<sub>2</sub>/min por µg de proteína. A partir de estos valores se calcularon diferentes ratios que nos dan información sobre el grado de acoplamiento de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (Hutter et al., 2004) (Gnaiger, 2012):

***Uncoupling Control Ratio (UCR)***: es el cociente entre el consumo de oxígeno en el estado E y el consumo de oxígeno en rutina (E/R) y expresa la capacidad respiratoria de reserva que tienen las células. La inversa de la UCR, R/E o ***Routine Respiratory Control Ratio***, indica el porcentaje de la capacidad máxima de respiración que utilizan las células en el estado de rutina.

***Respiratory Control Ratio (RCR)***: es el cociente entre la respiración en el estado E y el estado de *leak* (E/L) y mide el grado de acoplamiento de la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa. La inversa del RCR, L/E o ***Leak Respiratory Control Ratio***, indica el consumo de oxígeno que no está ligado a la fosforilación oxidativa respecto la capacidad máxima, y que se debe mayoritariamente al *proton leak*.

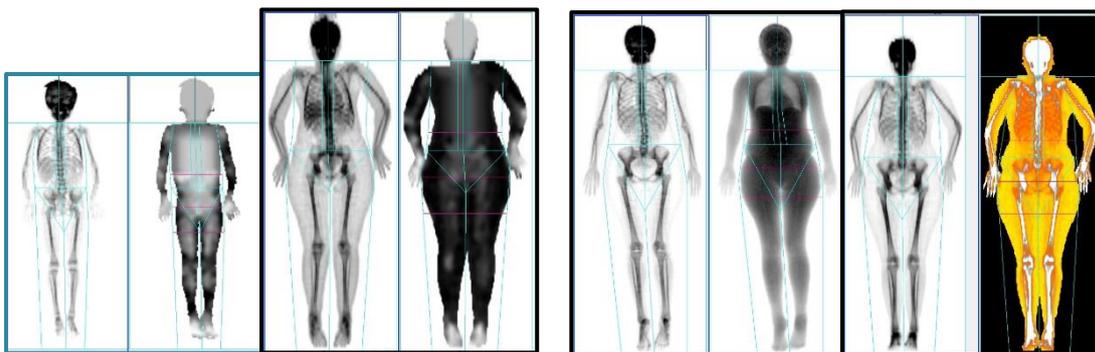
**Phosphorylation Respiratory Control Ratio (RCRp)**: es el cociente  $(R-L)/E$  e indica el porcentaje de la capacidad respiratoria máxima que utilizan las células ligado a la producción de ATP.

### 3.8 Análisis de composición corporal mediante Absorciometría de rayos X de energía dual (DXA)

Las mediciones de la composición corporal fueron hechas por Absorciometría radiológica de doble energía (DXA) con un aparato de General Electric Healthcare, modelo Prodigy, versión de software 12.3.

El aparato de DXA emite una radiación X que interacciona con el cuerpo del paciente y es convertida en radiación electromagnética secundaria que registramos durante su emisión. Parte de la radiación X emitida por el aparato es absorbida por el cuerpo por lo que la energía que es registrada por el aparato es menor a la emitida inicialmente y dependerá de la densidad y composición de cada tejido corporal. La técnica de DXA se basa en esta absorción diferencial de los rayos X por parte cada tejido corporal. Además, el DXA nos permite cuantificar en gramos el contenido de cada tejido en distintas regiones corporales seleccionadas (Blake et al., 1997).

La distinción que se realizó de cada región corporal proporcionó un análisis de la composición en un modelo de tres componentes: el contenido mineral esquelético o la masa ósea, la masa grasa y la masa libre de grasa (también llamada magra o muscular).



**Figura 13: Imágenes de DXA obtenidas en la exploración de cuatro pacientes con mutaciones en colágeno VI pertenecientes a nuestro estudio.** La primera imagen de cada panel muestra la densitometría ósea y la segunda imagen, la composición corporal. En la última paciente podemos distinguir en color naranja el tejido magro y en amarillo el tejido adiposo. Los dos paneles de la izquierda muestran un niño UCMD de 7 años y una niña UCMD de 12 años. Los dos paneles de la derecha muestran una mujer BM de 17 años y una mujer BM de 34.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la exploración, se colocó al paciente en decúbito supino, siguiendo las recomendaciones del fabricante para este tipo de exploración. Sin embargo, la técnica tuvo que ser adaptada a las características particulares de nuestros pacientes. En algunos casos, las mediciones de disposición de los pacientes se hicieron sobre la base de los resultados del hemisferio derecho, debido a sus limitaciones de tamaño. En ambos casos las mediciones totales se estimaron en los valores del hemisferio derecho. Se siguieron los protocolos de adquisición recomendados por la ISCD, de acuerdo a la edad de los pacientes.

En el estudio de DXA participaron un total de 12 pacientes con miopatía de Bethlem y 15 pacientes con UCMD. En el caso de los pacientes UCMD, 6 de los participantes tuvieron más de una medida de DXA a lo largo del tiempo, estas medidas fueron consideradas como medidas independientes por el tiempo transcurridas entre ellas. Lo mismo ocurrió con dos pacientes BM. Por lo que el número de determinaciones en UCMD resultó finalmente en 23 valoraciones independientes para y 14 en el caso de BM.

Las regiones exploradas en los pacientes fueron: cuerpo entero, extremidades superiores e inferiores, tronco, región abdominal inferior del tronco (limitado por crestas ilíacas y el límite superior de las costillas) y el sector de las caderas, estas dos últimas regiones designadas como región androide y ginecoide. En estas regiones se evaluaron las variables de densidad mineral ósea DMO en  $\text{g}/\text{cm}^2$ ; contenido mineral óseo en gramos, masa grasa en gramos y masa magra en gramos.

Con los resultados de las mediciones de las regiones exploradas se calcularon las siguientes variables, índices y relaciones:

- Cantidad de grasa en el tronco.
- Porcentaje de tejido adiposo en piernas
- Porcentaje de tejido adiposo en la región androide
- Porcentaje de tejido adiposo en la región ginecoide
- Relación tejido adiposo androide respecto tejido adiposo ginecoide.
- Índice de tejido adiposo: masa grasa corporal total (kg)/altura ( $\text{m}^2$ )
- Índice de masa magra: masa magra corporal (kg)/altura ( $\text{m}^2$ )
- Índice de Distribución de la grasa: porcentaje de grasa en el tronco /porcentaje de grasa en extremidades inferiores.

- Relación entre el tejido blando de las extremidades inferiores y extremidades superiores, ajustado por el tamaño del sujeto: (tejido blando extremidades inferiores / superiores de tejidos blandos extremidades) / altura (m<sup>2</sup>).
- Relación entre el tejido graso de las extremidades inferiores y extremidades superiores, ajustado por el tamaño del sujeto: (tejido graso extremidades inferiores / tejido graso extremidades superiores) / altura (m<sup>2</sup>).
- Relación entre el tejido magro de las extremidades inferiores y extremidades superiores, ajustado por el tamaño del sujeto: (tejido magro extremidades inferiores / tejido extremidades superiores magras) / altura (m<sup>2</sup>).
- Índice de masa muscular apendicular (*Apendicular free fat mass index* en inglés)

Para evaluar los cambios de composición corporal en los pacientes se compararon los resultados de las mediciones del grupo de pacientes con las de sujetos sanos con edad y sexo similares que fueron tomados como valores de referencia para cada una de las variables. Los datos de los controles sanos fueron cedidos por el Dr. Luis del Río (CETIR Centre Mèdic, Barcelona). Excepto el índice de masa corporal (BMI) de los pacientes infantiles, que fue comparado con la base de datos de la OMS usando el software “*WHO AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents*. Ginebra: WHO, 2009” (<http://www.who.int/growthref/tools/en/>)

En cada una de las variables se calculó la puntuación Z-score mediante la siguiente fórmula:

$$Z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

Dónde  $x$ =valor de medición del paciente;  $\mu$ =valor de la media de la población de referencia y  $\delta$ =valor de la desviación estándar de la población de referencia.

Se consideró un cambio estadísticamente significativo cuando Z-score>2 desviaciones estándar.

El signo positivo o negativo de Z, indicó la dirección de la desviación.

### 3.9 Medición de la función muscular en pacientes con déficit de colágeno VI

Para medir objetivamente la función física y la calidad de vida de los pacientes UCMD y BM se realizaron una serie de escalas estandarizadas validadas por el 173 consorcio internacional “European Neuromuscular Center (ENMC) International Workshop” en pacientes con distrofia muscular congénita incluyendo UCMD (Meilleur et al; 2015). Las mediciones se realizaron en colaboración con la Unidad de Rehabilitación y Medicina Física HSJD. A continuación se detallan los test y escalas realizados:

#### Test cronometrados de función:

- **6MWT (test de la marcha de los 6 minutos, *6 minutes walk test* en inglés):** Con este test se mide la cantidad de metros que el paciente es capaz de recorrer en 6 minutos.
- **Tiempo necesario para recorrer 10 metros, subir y bajar 4 escalones y levantarse de la posición supina:** A partir de estos tres test, representados individualmente, se evalúa si el paciente es capaz de realizar las acciones mencionadas y cuanto tiempo necesita para su ejecución.

#### Escalas de valoración funcional:

- **MFM (escalada de medición de la función motora):** Consiste en una escala de 32 ítems dónde cada ítem puntúa en una escala de 4 puntos: 0 puntos cuando el paciente no puede realizar el ejercicio, 1 punto cuando lo realiza de forma parcial, 2 puntos cuando el ejercicio se realiza de forma incompleta o incorrecta y 3 puntos cuando se lo realiza de forma completa y correcta.
- **NSAA (escala North Star):** Mide la actividad motora en pacientes ambulantes a partir de la realización de 17 ítems donde cada uno puntúa un máximo de 3 puntos: 0 puntos cuando el paciente es incapaz de realizar el ítem, 1 punto cuando es capaz adaptando la prueba y 2 cuando es completamente capaz.
- **EK2 (clasificación de Egen, versión 2):** Evalúa la función física de los pacientes basándose en 17 ítems que se puntúan de 0 a 3, siendo 0 la puntuación máxima y 3 la mínima. Es usada en la evaluación de los pacientes no ambulantes ya que las mediciones de funcionalidad se centran a las extremidades superiores y tronco.
- **PUL (escala de valoración funcional de extremidades superiores):** Se mide la actividad motora de las extremidades superiores basándose en ítems de las anteriores escalas con otros ítems nuevos añadidos.

**Evaluación de la percepción de la calidad de vida relacionada con la salud del paciente:**

- **PedsQL (Paediatric Quality of Life):** Mide a partir de 15 ítems la calidad de vida relacionada con la salud basada en la percepción del paciente sobre su enfermedad. Las puntuaciones más altas reflejan peor salud física y psicosocial (Varni et al., 1999). Existe un test específico según el rango de edad del paciente, a excepción de los menores de 4 años que no son evaluados. Independientemente de la edad del paciente, sus padres/tutores legales responden un cuestionario similar basado en la calidad de vida de sus hijos.

		Ambulantes	No ambulantes
<b>Test cronometrados de función</b>	6MWT	X	
	Recorrer 10 metros	X	
	Subir 4 escalones	X	
	Bajar 4 escalones	X	
	Levantarse de posición supina	X	
<b>Escalas de valoración funcional</b>	MFM	X	
	NSAA	X	
	EK2		X
	PUL	X	X
<b>Evaluación de la percepción de la calidad de vida</b>	PedsQL	X	X

**Tabla 8: Clasificación de los test y escalas realizados en pacientes con déficit de colágeno VI para evaluar la función motora y la calidad de vida.**

### 3.10 Estadística

Los resultados de este trabajo se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM), exceptuando los casos que se indica lo contrario. Para la comparación de dos grupos independientes, la significancia entre medias de la población se evaluó mediante la prueba *t* de Student aplicada de manera bilateral y se expresó como el valor de probabilidad *p*. En todos los casos  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Para estudiar la asociación entre los parámetros de DXA, parámetros bioquímicos y evaluaciones funcionales, se calcularon mediante el software SPSS los coeficientes de correlación de Pearson y se expresaron gráficamente ajustando la correlación a la recta de regresión mediante el coeficiente de

## MATERIALES Y MÉTODOS

determinación ( $R^2$ ). Las representaciones gráficas de los experimentos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism y R.

# **CAPÍTULO 1**

---



## **4 RESULTADOS CAPÍTULO 1**

---



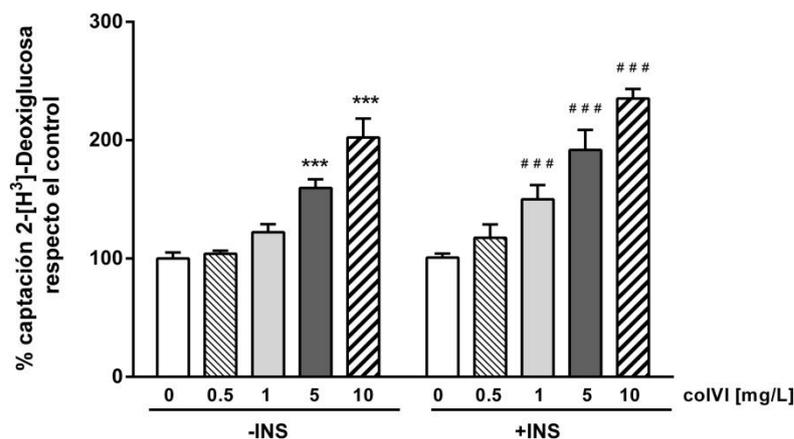
## 4.1 Papel del colágeno VI en la captación de glucosa *in vitro*

### 4.1.1 Caracterización del efecto del colágeno VI en la captación de glucosa en células musculares

Con el fin de determinar si el colágeno VI es capaz de modificar la captación de glucosa en un sistema *in vitro*, se trataron miotubos LHCN-M2 con colágeno VI soluble a distintos tiempos y concentraciones y posteriormente se midió la incorporación de glucosa en comparación con miotubos no tratados.

Las dosis de colágeno VI soluble usadas fueron establecidas basándose en la dosis probadas anteriormente en experimentos *in vitro* (Rühl et al., 1999) (Rühl et al., 1999), siendo finalmente administrado a las células en cultivo a concentraciones de 0,5mg/L; 1mg/L; 5mg/L y 10 mg/L con el objetivo de trazar un efecto dosis-dependiente. Así mismo, con el propósito de precisar la variación del efecto del colágeno VI en la captación de glucosa a lo largo del tiempo, se realizaron tratamientos con colágeno VI a 20 minutos, 40 minutos, 2 horas y 16 horas. Dado el papel regulador positivo de la insulina en la captación de glucosa, se usaron como control positivo miotubos LHCN-M2 tratados con 100nM de insulina. De este modo, se establecieron dos condiciones basales, una con insulina y otra sin insulina que sirvieron como control de los miotubos tratados con colágeno y posteriormente con o sin insulina que nos permitieron estudiar el efecto del colágeno VI por sí solo y conjuntamente a la acción de la insulina.

Los resultados obtenidos de las mediciones de captación de glucosa nos muestran un aumento significativo de la captación de glucosa, sin efecto de la insulina, tras un tratamiento con colágeno VI a concentraciones de 5mg/l y 10mg/L, provocando esta última una acción mayor (aumento del 102,26% respecto la condición basal). En las mediciones resultantes de la estimulación de colágeno VI junto a la insulina observamos un efecto muy similar, en este caso el aumento es mayor que en las células no estimuladas con insulina a las dosis 5mg/L y 10mg/L de colágeno (aumento del 91,81% y del 135,30% respecto la condición basal), probablemente resultado de un efecto sumatorio de los efectos de la insulina y el colágeno VI. Asimismo, observamos un aumento significativo en la captación de glucosa a partir de concentraciones menores (1mg/L).

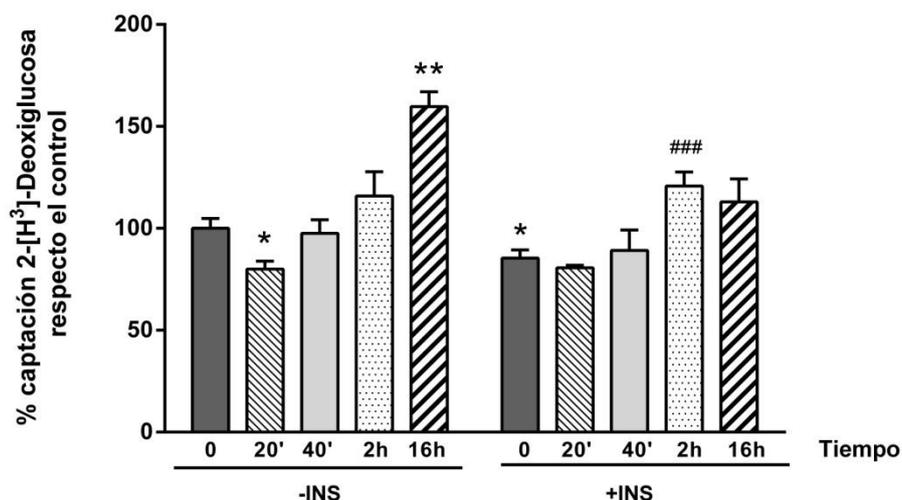


**Figura 14: Efecto dosis-respuesta del colágeno VI en la captación de glucosa en miotubos LHCN-M2.** Los miotubos LHCN-M2 fueron tratados con 0,5; 1; 5 o 10mg/l de colágeno VI soluble y 5mM de glucosa durante 16 horas. A continuación, las células fueron incubadas con o sin 100nM de insulina y con o sin colágeno VI a las concentraciones descritas durante 20 minutos y se midió la incorporación de 2-[H<sup>3</sup>]-Desoxiglucosa tal y como se describe en el apartado 3.7.1 de Materiales y métodos. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Prueba *t* de Student, \*\*\**P*<0,001 respecto el control sin insulina y ###*P*< 0,001 respecto el control con insulina.

Al estudiar el efecto del colágeno VI en la captación de glucosa a distintos tiempos sin coestimulación con insulina observamos un aumento de la captación de glucosa a lo largo del tiempo. No obstante, el aumento máximo se alcanzó tras 16 horas de estimulación con colágeno VI con un incremento del 60,40% en relación a la condición basal. De manera opuesta, a 20 minutos de estimulación con colágeno VI, la captación de glucosa se vio reducida significativamente un 20% respecto la condición basal.

Al combinar ambos tratamientos de colágeno VI e insulina solo observamos un aumento significativo de la captación de glucosa a las 2 horas de estimulación con colágeno.

Teniendo en cuenta estos resultados podemos hablar de un efecto dosis-dependiente del colágeno VI en la captación de glucosa independiente de la insulina dado que en ambos casos, tanto con o sin estimulación de insulina, observamos un aumento en la captación de glucosa y que a mayores concentraciones de colágeno, mayor es este aumento. Así mismo, el efecto máximo del colágeno VI en la captación de glucosa ocurre tras 16 de estimulación con colágeno VI.



**Figura 15: Efecto a lo largo del tiempo del colágeno VI en la captación de glucosa en miotubos LHCN-M2.** Los miotubos LHCN-M2 fueron tratados con 5mM de glucosa y 5mg/l de colágeno VI soluble durante 20 o 40 minutos o bien 2 o 16 horas. Tras el tratamiento con colágeno VI, las células fueron incubadas con o sin 100nM de insulina y con o sin 5mg/l de colágeno VI durante 20 minutos y se midió la incorporación de 2-[H<sup>3</sup>]-Desoxiglucosa tal y como se describe en el apartado 3.1.7 de Materiales y métodos. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de un experimento realizados con cuadruplicados para cada condición. Prueba *t* de Student, \**P* < 0,05; \*\**P* < 0,01 respecto la condición basal sin insulina y ###*P* < 0,01 respecto el control con insulina.

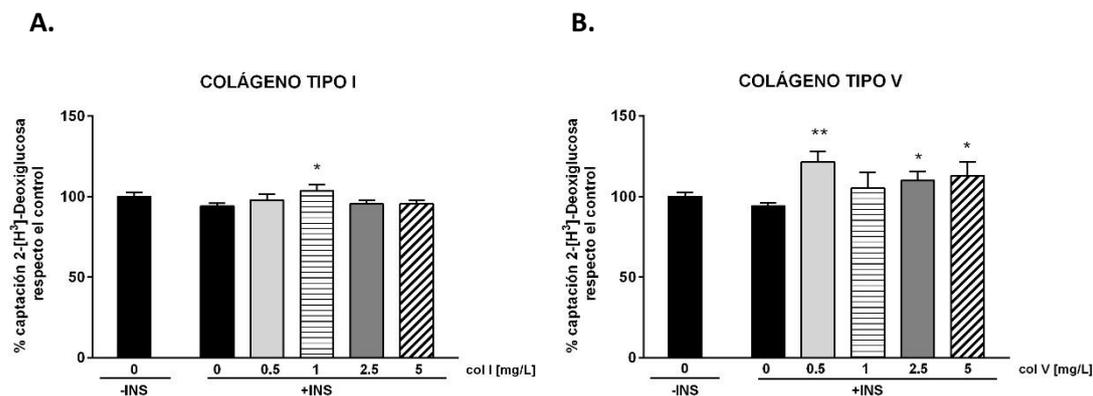
#### 4.1.2 Estudio del efecto de los colágeno I y V en la captación de glucosa en células musculares

Pese a que el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el efecto del colágeno de tipo VI en la homeostasis de la glucosa, otros tipos de colágeno han sido relacionados con alteraciones metabólicas incluyendo alteraciones en la captación de glucosa en modelos animales deficientes (Huang et al., 2011). Por consiguiente, fue de nuestro interés estudiar el efecto de otros colágenos en la captación de glucosa tras 16 horas de estimulación, emulando el tiempo de tratamiento con colágeno VI que producía un mayor efecto en los miotubos LHCN-M2.

De igual manera, el tratamiento con los colágenos fue combinado con estimulación con insulina para de este modo evaluar si otros tipos de colágeno eran capaces de producir un efecto en la captación de glucosa por si solos o en combinación con ambos estímulos como ya habíamos visto para el colágeno de tipo VI. Los colágenos empleados fueron el tipo I y el tipo V, los cuales se disponen en una larga estructura fibrilar parecida en la matriz extracelular, a diferencia del colágeno VI cuya estructura forma una red fibrótica irregular. Ambos tipos de colágeno son abundantes en músculo y concretamente el colágeno de tipo V ha sido relacionado anteriormente con el correcto desarrollo y funcionamiento del metabolismo del músculo esquelético (Huang et al., 2011). Las dosis usadas para el ensayo fueron las mismas para los dos

colágenos tomando como dosis máxima 5mg/L, aquella a partir de la cual se observó un efecto significativo para el tratamiento con colágeno VI como se ha mostrado anteriormente.

Al tratar los miotubos con 1mg/L colágeno I soluble observamos un aumento significativo en la captación de glucosa, este efecto no se observó para las otras dosis empleadas. Sin embargo, cuando se examinó el efecto del colágeno tipo V, se encontró una respuesta positiva al tratamiento con las dosis de 0,5mg/L; 2,5mg/L y 5mg/L.



**Figura 16: Efecto de los colágenos tipo I y V en la captación de glucosa en miotubos LHCN-M2.** Los miotubos LHCN-M2 fueron tratados con 5mM de glucosa y con 0,5; 1; 2,5 o 5mg/l de colágeno I (A) o colágeno V (B) soluble durante 16 horas. A continuación, las células fueron incubadas con o sin 100nM de insulina y con o sin colágeno I o V a las concentraciones descritas durante 20 minutos y se midió la incorporación de 2-[H<sup>3</sup>]-Desoxiglucosa tal y como se describe en el apartado 3.1.7 de Materiales y métodos. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Prueba *t* de Student, \**P*<0,05 y \*\**P*<0,01 respecto el control con insulina.

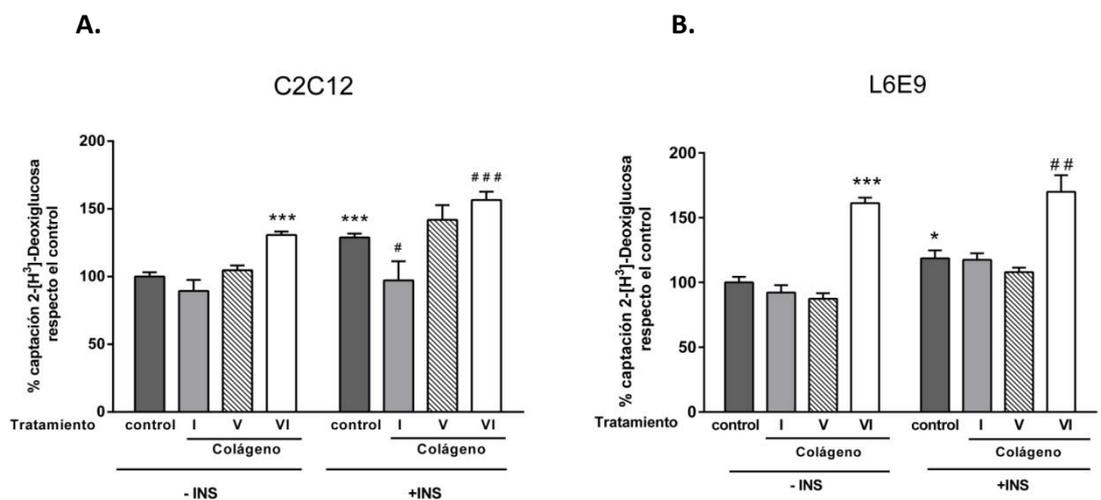
#### 4.1.3 Estudio y comparación del efecto de los colágeno I, V y VI en la captación de glucosa en líneas celulares miogénicas y adipocitarias.

El modelo celular LHCN-M2 utilizado hasta el momento en los ensayos de captación de glucosa mostró una reducida respuesta al estímulo de la insulina. Tanto para corroborar nuestros hallazgos hasta el momento, como para estudiar dichos efectos en líneas celulares con mayor sensibilidad a la insulina, se midió el impacto del tratamiento con los colágenos solubles I, V y VI en la captación de glucosa en los miotubos de las líneas musculares C2C12 y L6E9. De igual modo, dada la abundancia del colágeno VI no solo en músculo, sino también en tejido adiposo siendo el tipo de colágeno más abundante en él (Scherer et al., 1998), y la importancia de este

tejido en la regulación del metabolismo de la glucosa (Rosen et al., 2006), se reprodujeron dichos ensayos en adipocitos de la línea SGBS.

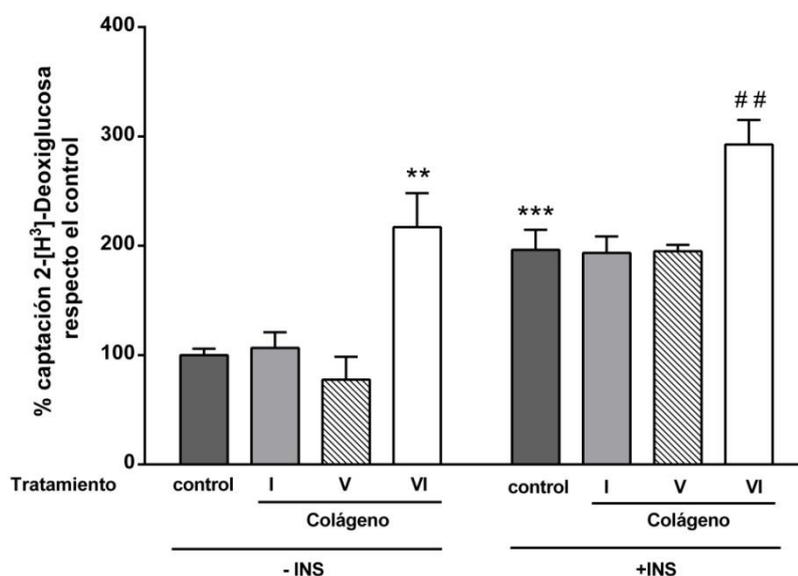
Los ensayos realizados en miotubos de la línea C2C12 tras un tratamiento con colágeno I soluble mostraron un aumento significativo de la captación de glucosa en presencia de un coestímulo con insulina tal y como ya habíamos observado en la línea LHCN-M2. Por el contrario, el efecto del colágeno tipo V en esta línea solo resultó significativo al comparar los miotubos tratados con colágeno V conjuntamente con insulina y los miotubos tratados únicamente con colágeno V, pero no al compararlos con los controles que habían estado tratados únicamente con insulina. Este hallazgo, por consiguiente, puede ser únicamente reflejo del efecto de la insulina en la captación de glucosa, pero no demuestra ninguna acción del colágeno V en la línea C2C12. El colágeno VI, por el contrario, y coincidiendo con los resultados hallados en los miotubos LHCN-M2, mostró un efecto significativo promoviendo por si solo la captación de glucosa alcanzando valores muy similares a los derivados de la estimulación con insulina en relación a la condición basal (130,59% y 128,75% respectivamente). El tratamiento conjunto de colágeno VI con insulina resultó en valores incluso más altos (aumento del 56,57%) que aquellos obtenidos mediante la acción sola de la insulina (aumento del 28,75%) respecto la condición basal.

La otra línea miogénica usada para el estudio del efecto de los distintos tipos de colágeno analizados hasta el momento fue la L6E9. En este caso el único colágeno empleado que condujo a un aumento en la captación de glucosa fue el colágeno soluble de tipo VI. El efecto se observó tanto con y sin coestimulación con insulina y en ambos casos y de manera muy parecida (169,94% y 161,27%) se superaron los valores provocados por la acción única de la insulina (118,55%).



**Figura 17: Efecto de los colágenos tipo I, V y VI en la captación de glucosa en miotubos C2C12 y L6E9.** Se determinó la incorporación de 2-[H<sup>3</sup>]-Desoxiglucosa tras un tratamiento de 16 horas con 5mM de glucosa y con 10mg/l de colágeno de tipo I, V o VI y un tratamiento posterior de 20min con o sin 100nM de insulina en miotubos C2C12 (A) y miotubos L6E9 (B). Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Prueba *t* de Student, \**P*<0,05 y \*\*\**P*<0,001 respecto el control sin insulina y ##*P*<0,01 y ###*P*<0,001 respecto el control con insulina.

Los resultados tras el tratamiento con colágeno VI en células adipocitarias de la línea SGBS mostraron un aumento significativo en la captación de glucosa incluso mayor que el alcanzado hasta la fecha en las anteriores líneas miogénicas. Este efecto fue presente tanto con y sin estimulación con insulina (aumento del 191,87% y 117,07% respecto la condición basal) mientras que los colágenos de tipo I y V no tuvieron ningún efecto en la captación de glucosa en los adipocitos SGBS.



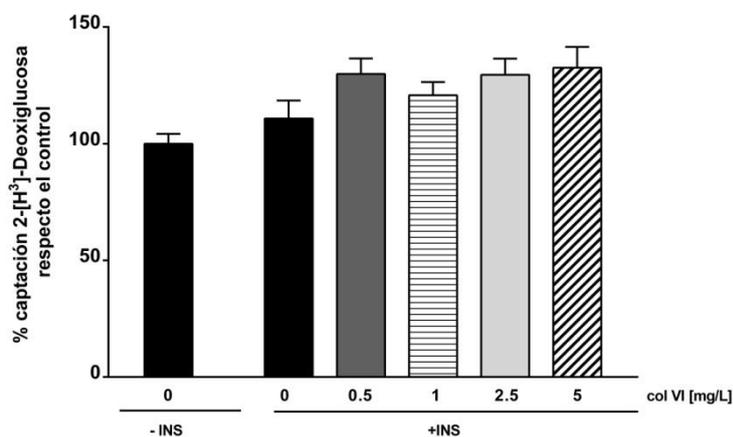
**Figura 18: Efecto de los colágenos tipo I, V y VI en la captación de glucosa en adipocitos SGBS.** Los adipocitos SGBS se trataron durante 16 horas con 5mM de glucosa y con 5mg/l de colágeno de tipo I, V o VI. A continuación, se trataron con o sin insulina y con o sin colágeno I, V y VI a las concentraciones descritas durante 20 minutos y se determinó la incorporación de 2-[<sup>3</sup>H]-Desoxiglucosa. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de dos experimentos realizados por triplicado. Prueba t de Student, \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$  respecto el control sin insulina y ## $P < 0,01$  respecto el control con insulina.

#### 4.1.4 Efecto colágeno VI inmovilizado en la captación de glucosa

Previamente, se ha descrito que el colágeno VI puede ejercer distintos efectos *in vitro* cuando es usado en forma soluble o como una proteína de revestimiento de la superficie de crecimiento de las células en cultivo (Martin Rühl, 1999) (Smeriglio et al., 2015). Por esta razón se realizaron estudios de captación de glucosa en miotubos cultivados en placas recubiertas con concentraciones crecientes de colágeno VI y estimulados posteriormente con insulina. En contraste con lo observado cuando el colágeno VI se administraba de forma soluble en el medio de depleción de las células, ningún efecto sobre la captación de glucosa fue advertido a ninguna

## RESULTADOS CAPÍTULO 1

concentración testada en las células crecidas sobre una monocapa de colágeno VI. Estos resultados nos muestran que solo el colágeno VI en su forma soluble es capaz de producir su efecto estimulando la captación de glucosa.



**Figura 19: Determinación de la captación de glucosa en miotubos LHCN-M2 crecidos sobre un sustrato de colágeno VI.** Las células LHCN-M2 se crecieron y diferenciaron en placas recubiertas con 0,5; 1; 2,5 o 5mg/l de colágeno VI. Una vez diferenciadas, se trataron con o sin 100nM de insulina durante 20 minutos y se midió la captación de 2-[H<sup>3</sup>]-Desoxiglucosa. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de dos experimentos realizados por cuadruplicado.

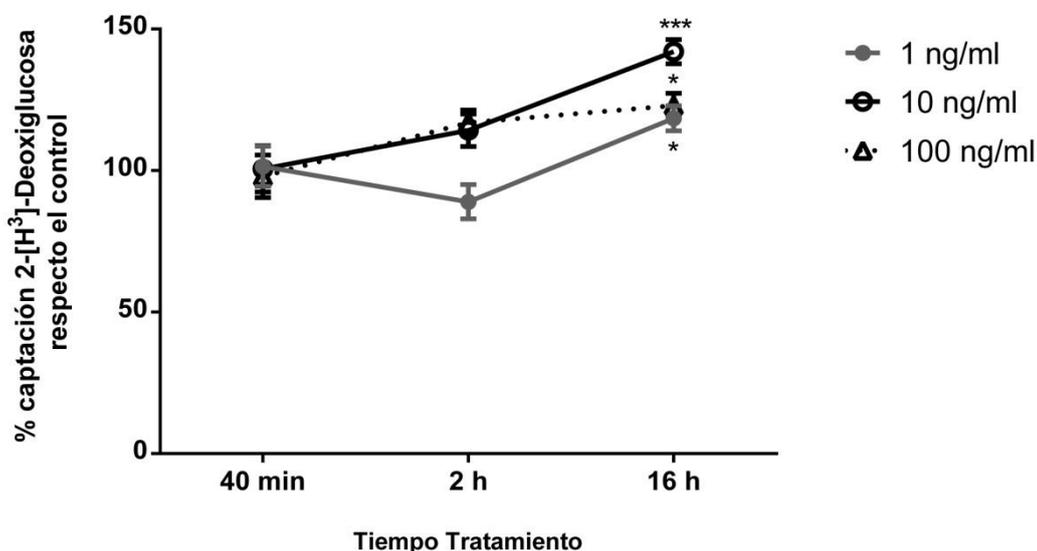
### 4.1.5 Efecto endotrofina en la captación de glucosa

Dada la existencia de un fragmento soluble activo más pequeño que la molécula entera de colágeno VI, al que recientemente se ha relacionado con un papel tanto en metabolismo como en el contexto de proliferación tumoral (Sun et al., 2014), nuestros datos nos llevaron a plantear la cuestión si este fragmento C-terminal de la molécula de colágeno VI, llamado endotrofina, podía ser la responsable del efecto observado hasta entonces.

Por consiguiente, se trataron miotubos C2C12 con endotrofina recombinante humana soluble en el mismo rango de concentraciones y en los mismos tiempos ensayados para los experimentos de colágeno VI soluble y medimos el impacto en la captación de glucosa.

Se observó una respuesta positiva al tratamiento con endotrofina en la captación de glucosa de una manera tiempo dependiente, excepto a la concentración de 1ng/ml de colágeno VI dónde la captación de glucosa se vio disminuida respecto la condición basal a las 2 horas, para luego aumentar de nuevo a las 16 horas superándose los niveles basales. Se logró un aumento significativo en la captación de glucosa para todas las concentraciones testadas a las 16 horas de tratamiento en relación a la condición basal: 1ng/ml (18,45%), 10ng/ml (42,03%) y 100ng/ml

(22,96%), siendo 10ng/ml la mayor respuesta observada. Estos datos demuestran que tanto el colágeno VI como el fragmento endotrofina en sus formas solubles son capaces de promover por si solos sin efecto de la insulina la captación de glucosa en células en cultivo.



**Figura 20: Efecto dosis-respuesta a lo largo del tiempo de la endotrofina en la captación de glucosa en miotubos C2C12.** Los miotubos C2C12 fueron tratados con 1; 10 o 100mg/l de endotrofina soluble y 5mM de glucosa durante 16 horas. Después de este tiempo de tratamiento, las células fueron incubadas con o sin 100nM de insulina y con o sin endotrofina a las concentraciones descritas durante 20 minutos y se procedió a la medición de la incorporación de 2-[H<sup>3</sup>]-Desoxiglucosa tal y como se describe en el apartado 3.1.7 de Materiales y métodos. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Prueba *t* de Student, \**P*<0,05 y \*\*\**P*<0,001 respecto a la condición basal.

#### 4.1.6 Efecto del colágeno VI en la síntesis de glucógeno

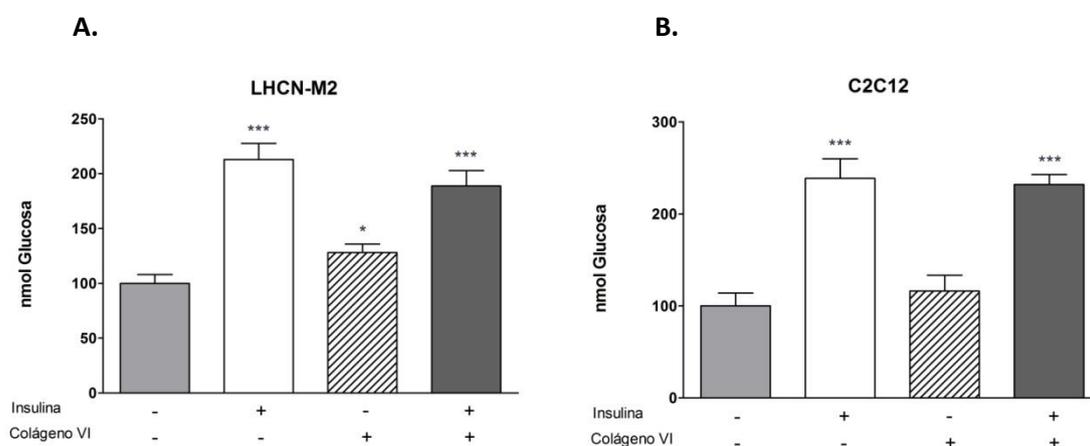
La captación de glucosa promovida por la acción de la insulina resulta en un aumento de la síntesis de glucógeno causado por la activación de la enzima glucógeno sintasa (GS) (Sutherland, 2011) en el músculo esquelético. Teniendo en cuenta la acción positiva del colágeno VI en la captación de glucosa observada en los experimentos anteriores, se apostó por medir su efecto en la tasa de síntesis de glucógeno en miotubos LHCN-M2 y C2C12. La medición se hizo mediante la incorporación de glucosa marcada radiactivamente en glucógeno después de un período de privación de glucosa que sirvió para agotar las reservas de glucógeno presentes en los miotubos mantenidos en cultivo en medio DMEM con altas concentraciones de glucosa (25mM).

## RESULTADOS CAPÍTULO 1

Los miotubos fueron tratados con 5mg/l de colágeno VI soluble durante 16 horas y/o 100nM de insulina durante 20 minutos posteriormente tal y como se había hecho en los ensayos de captación de glucosa.

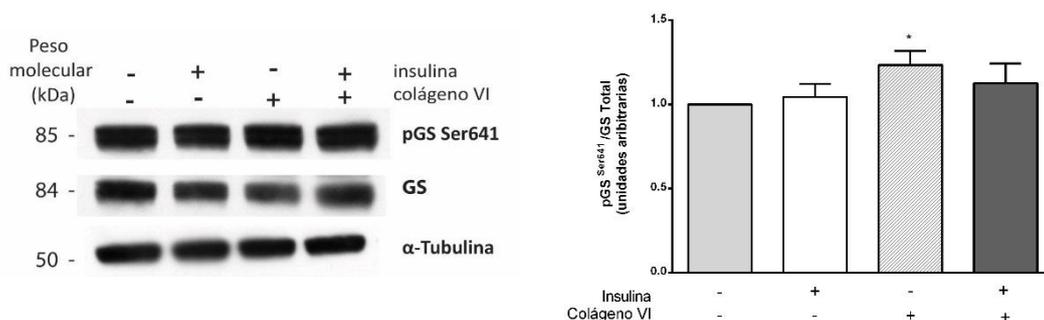
Efectivamente, en los miotubos LHCN-M2, el colágeno VI fue capaz de promover la síntesis de glucógeno por si solo (+28,29% respecto la condición basal) pero en menor medida que la insulina (+112,93% respecto la condición basal) mostrando que al menos una parte de la glucosa captada por la célula después de un estímulo con colágeno VI es convertida a glucógeno.

Por el contrario, los resultados obtenidos en células C2C12 no revelaron ningún efecto del colágeno VI en la captación de glucosa por si solo o en combinación con insulina ( $P=0,2390$  y  $P=0,7510$ ).



**Figura 21: Determinación de la tasa de síntesis de glucógeno en miotubos LHCN-M2 y C2C12 tratados con colágeno VI soluble.** Los miotubos LHCN-M2 (A) y C2C12 (B) fueron tratados con 5mg/l de colágeno VI soluble y 5mM de glucosa durante 16 horas. El día siguiente, se incubaron con 10mM de glucosa [U-<sup>14</sup>C] con o sin 100mM de insulina y con o sin 5mg/l de colágeno VI durante dos horas y se determinó la tasa de síntesis de glucógeno tal y como se describe en el apartado 3.1.2 de Materiales y métodos. Las gráficas representan la media  $\pm$  error estándar de dos experimentos realizados por triplicado. Prueba *t* de Student, \* $P$  0,05 y \*\*\* $P$  0,001 respecto la condición basal.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la síntesis de glucógeno se precede de una activación de la enzima glucógeno sintasa (GS), esto ocurre cuando la proteína se desfosforila por acción indirecta de la insulina. Al estudiar el estado de fosforilación de GS (P-GS Ser641) después del tratamiento con colágeno VI en los miotubos C2C12 se observó un aumento significativo ( $P=0,030$ ) de la fosforilación de GS representando una disminución de la actividad de la enzima y, por tanto, de la síntesis de glucógeno.



**Figura 22: Efecto del colágeno VI sobre los niveles totales y la fosforilación de la proteína GS en miotubos C2C12.** Los lisados totales celulares fueron obtenidos de miotubos C2C12 tratados con o sin 5mg/l de colágeno VI soluble durante 16 horas y con o sin 100nM de insulina durante 20 minutos. 25µg de proteína proveniente de cada lisado se analizaron por *Western Blot* con los anticuerpos anti-GS y anti-P-GS (Ser641) y  $\alpha$ -tubulina como control de carga. El panel superior muestra una imagen representativa del análisis por *Western Blot* (A) y la gráfica inferior representa la media $\pm$ error estándar de la densitometría de cuatro experimentos independientes (B). Los niveles de cambio para GS y P-GS (Ser641) se calcularon en relación a la condición basal corregidos por  $\alpha$ -tubulina. Prueba *t* Student, \* $P < 0,05$  respecto el control.

## 4.2 Estudio de la vía implicada en el efecto del colágeno VI y la ETP en la captación de glucosa

### 4.2.1 Implicación de ILK en la mediación del efecto de colágeno VI y ETP

Hasta la fecha, no se ha identificado el receptor específico de colágeno VI en células musculares. No obstante, los receptores integrina, conforman el mayor grupo de receptores encargados de mediar uniones entre la célula y matriz extracelular (Hynes, 2002) la cual está compuesta, entre otras proteínas, por distintos tipos de colágenos.

Las integrinas son un grupo de proteínas transmembrana, formadas por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , heterodímeros que contienen la isoforma  $\beta 1$  son capaces de unir distintos tipos de colágeno (Leitinger, 2007) incluido el colágeno VI (Tillet et al., 2002). Esta misma isoforma ha sido descrita en músculo (Mayer, 2003) (Liu et al., 2008).

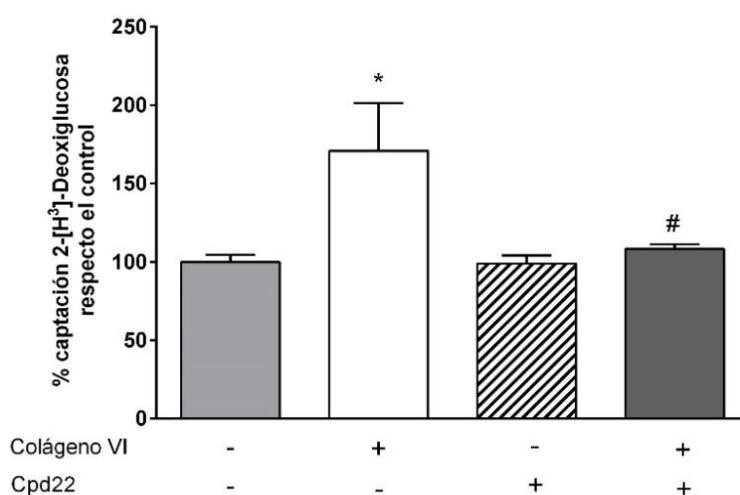
La quinasa ILK (abreviado del inglés *integrin linked kinase*) es capaz de unirse a la subunidad beta 1 que a su vez fosforila la proteína AKT y esta, su substrato GSK3 regulando finalmente distintos procesos biológicos (Persad et al., 2001).

En este trabajo se propuso la posibilidad de que el colágeno VI y la endotrofina se unieran de forma específica al receptor transmembrana integrina  $\beta 1$ . Esta unión del colágeno a su receptor

## RESULTADOS CAPÍTULO 1

activaría la ILK que a su vez, promovería la activación intracelular de vías de señalización que resultarían en un aumento de la captación de glucosa. Para evaluar esta posibilidad se midió la captación de glucosa en las células C2C12 tratadas con 5mg/l de colágeno VI o 10mg/l endotrofina y 2 $\mu$ M del compuesto 22 (Cpd22), un inhibidor específico de la ILK.

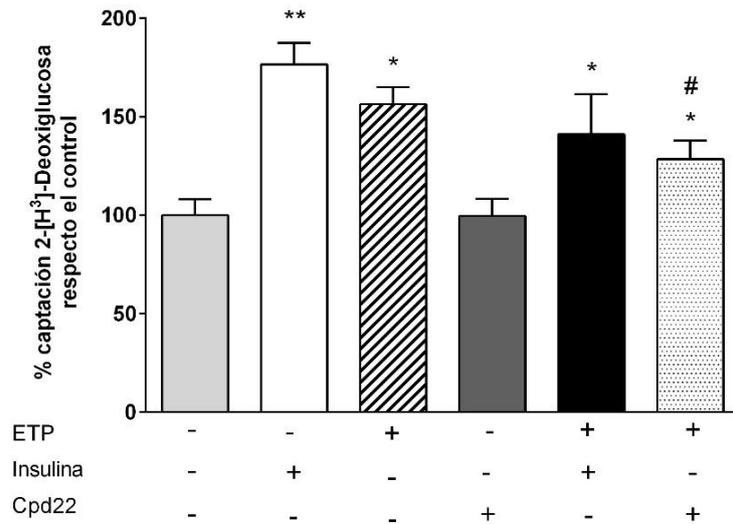
En las células C2C12 tratadas con el inhibidor de ILK (Cpd22) junto con el colágeno VI se observó una reducción de la captación de glucosa con respecto al efecto del colágeno VI por sí solo, reduciéndose así el incremento en la captación de glucosa, respecto la condición basal, de un 70,89% en las células tratadas con colágeno al 9,26% de aquellas tratadas con colágeno VI y Cpd22 conjuntamente.



**Figura 23: Captación de glucosa en miotubos C2C12 tratados con colágeno VI y Cpd22.** La incorporación de 2-[H<sup>3</sup>]-Desoxiglucosa se midió tal y como se describe en el apartado 3.1.7 de Materiales y métodos en miotubos C2C12 tratados con 2 $\mu$ M de compuesto 22 (Cpd22) y 5mg/l de colágeno VI durante 24 y 16 horas respectivamente. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de cuatro experimentos independientes. Prueba *t* de Student, \**P* < 0,05 respecto el control y #*P* < 0,01 respecto la condición con colágeno VI.

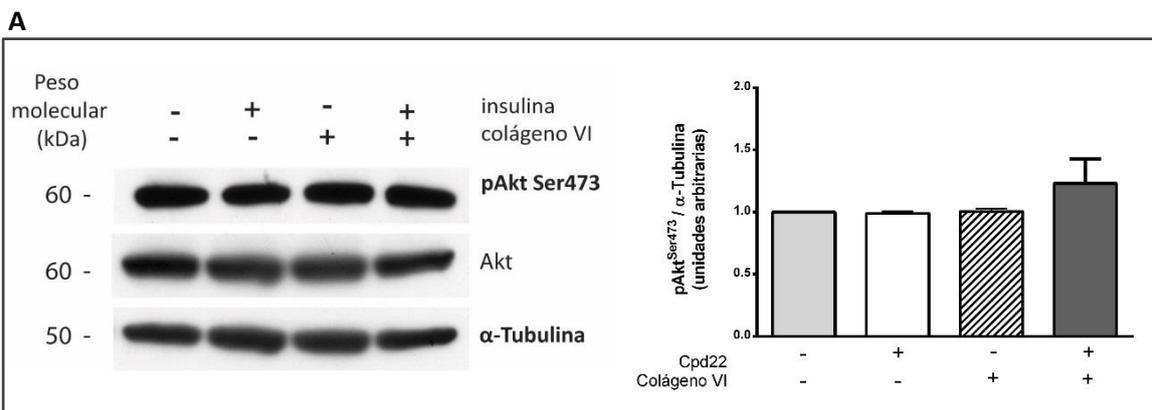
Del mismo modo Cpd22 inhibió significativamente (*P*=0,045) en un 28,05% el aumento en la captación de glucosa promovida por la endotrofina a pesar de que la inhibición de la endotrofina por parte de Cpd22 no fue suficiente para recuperar los niveles basales y permaneció de manera significativa (*P*=0,039) un 28,37% más alta que el estado basal.

De este modo, se confirma que la activación de la ILK es necesaria para la captación de glucosa mediada por colágeno VI y endotrofina en las células C2C12.

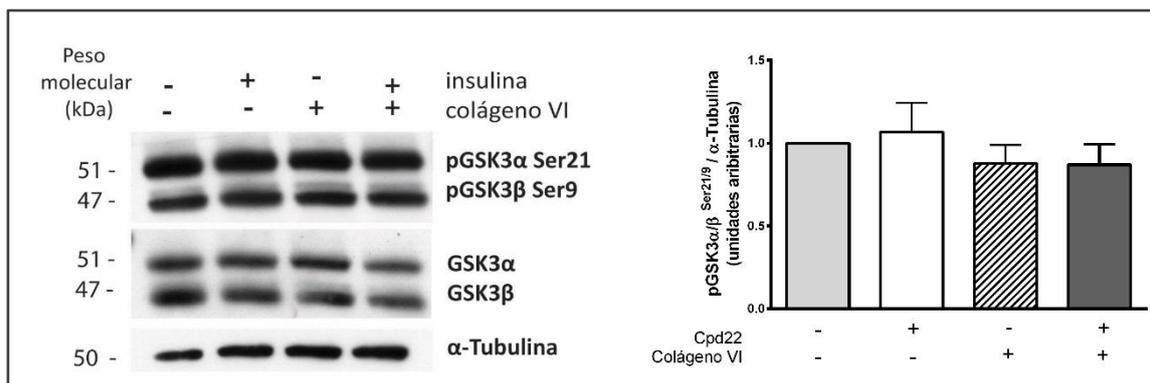


**Figura 24: Captación de glucosa en miotubos C2C12 tratados con endotrofina y Cpd22.** La incorporación de 2-[H<sup>3</sup>]-Desoxiglucosa se midió tal y como se describe en el apartado 3.1.7 de Materiales y métodos en miotubos C2C12 tratados con 2μM de compuesto 22 (Cpd22) y 10mg/l de ETP durante 24 y 16 horas respectivamente. Los datos se representan como la media ± error estándar de cuatro experimentos independientes. Prueba *t* de Student, \**P* <0,05; \*\**P*<0,01 respecto el control y #*P*< 0,01 respecto la condición con ETP.

Por otro lado, se analizó la proteína fosforilada AKT (P-AKT Ser473) y GSK3α/β (P-GSK3 Ser21/9), así como los niveles totales de ambas, después del tratamiento con colágeno VI y/o el inhibidor Cpd22. No se detectaron alternaciones significativas en los niveles de proteína AKT y GSKα/β fosforilada o total tras el tratamiento con colágeno VI y/o con Cpd22.



B



**Figura 25: Efecto del inhibidor Cpd22 sobre los niveles totales y la fosforilación de las proteínas GSK y Akt en miotubos C2C12.** Cultivos de miotubos C2C12 fueron tratados con 2µM de Cpd22 y 5mg/l de colágeno VI durante 24 y 16 horas respectivamente. Los lisados celulares fueron analizados por *Western Blot* con anticuerpos contra Akt, P-Akt (Ser473), GSK3α/β y P-GSK3 α/β (Ser21/9) y α-tubulina como control de carga. El panel muestra una imagen representativa del análisis por *Western Blot* y la media±error estándar de la densitometría de cuatro experimentos independientes para la detección de Akt (A) y GSK3α/β (B). Los niveles de cambio para cada proteína se calcularon en relación a la condición basal corregidos por α-tubulina.

#### 4.2.2 Efecto del colágeno VI en la vía PI3K/Akt

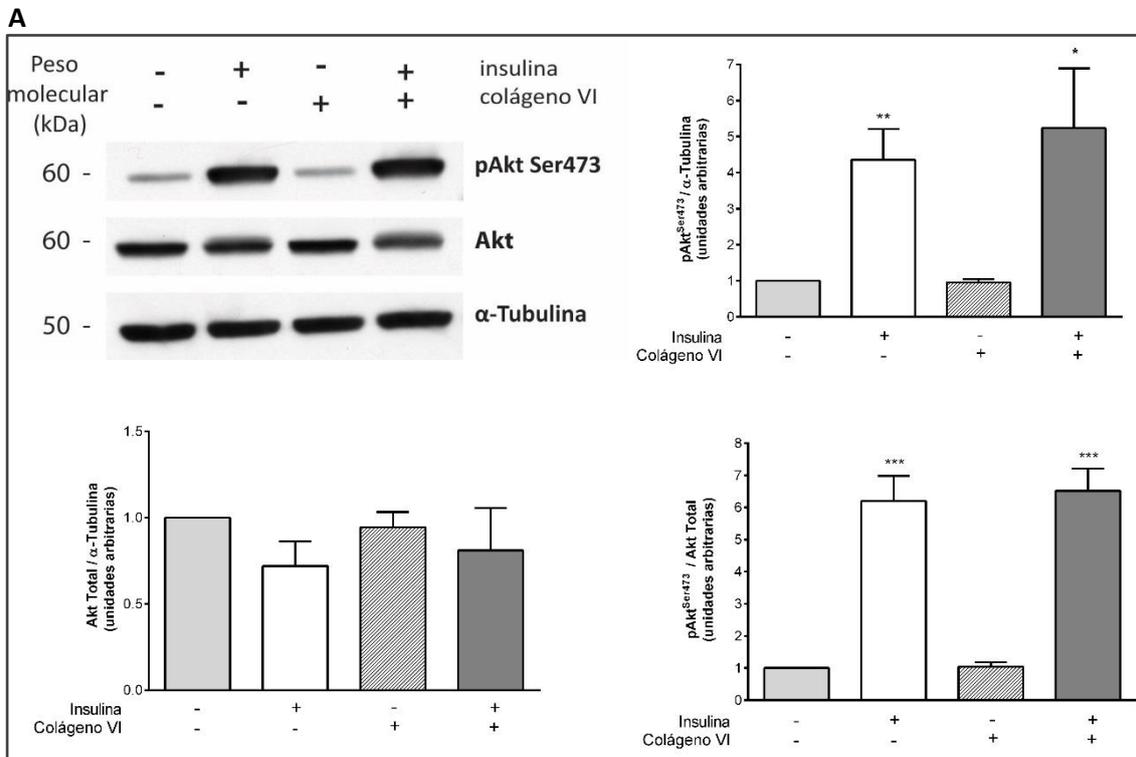
El mantenimiento de la homeostasis energética depende del balance correcto entre la disponibilidad y la demanda energética de los distintos órganos del organismo. La comunicación del estado de este balance entre órganos se lleva a cabo a través de metabolitos y también hormonas, entre las cuales se encuentra la insulina (Pang et al., 2014) (J. B. Kim, 2016). La insulina es la hormona responsable de la activación de la captación de glucosa en el tejido muscular y adiposo dónde se almacena en forma de glucógeno y triglicéridos respectivamente. La vía por la cual la insulina es capaz de promover la captación de glucosa después de su unión a su receptor es la vía PI3K/Akt (Manning et al., 2007).

Con el objetivo de evaluar si el efecto del colágeno VI observado en la captación de glucosa se efectuaba a través de la vía de señalización PI3K/Akt activada por la insulina, estudiamos niveles de proteína total y fosforilada de diferentes substratos claves en la vía PI3K/Akt en las líneas celulares C2C12 y 3T3-L1 después de un tratamiento de 16 horas con colágeno VI soluble y/o estimulación posterior con 100nM de insulina durante 20 minutos.

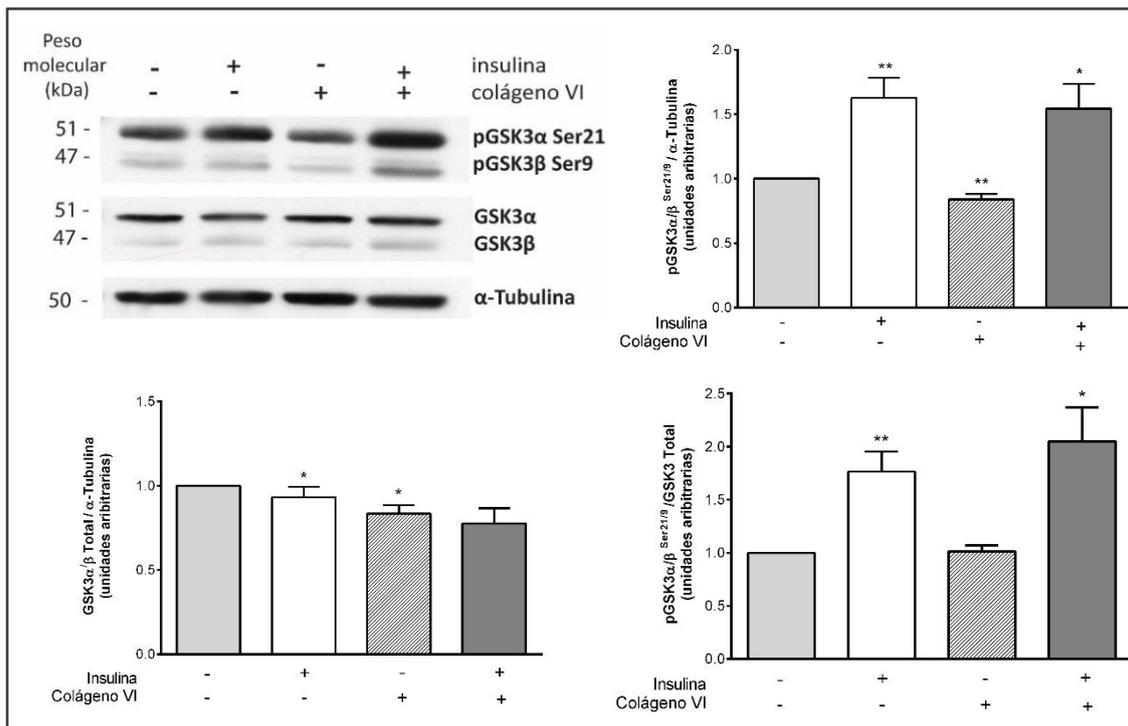
El estudio de la proteína fosforilada Akt (P-Akt Ser473) en miotubos C2C12 como indicador de la activación de la vía PI3K/Akt no mostró ningún cambio significativo, así como los niveles de proteína total, tras el tratamiento con colágeno VI.

Por otro lado, el estudio del estado de fosforilación de la proteína GSK3 $\alpha/\beta$  (P-GSK3 Ser21/9), sustrato de AKT, reveló una disminución de la fosforilación indicando una menor inactivación de la proteína GSK3 tras el tratamiento con colágeno VI, asimismo los niveles totales de la proteína también se vieron reducidos después del tratamiento con colágeno VI, por lo que la ratio entre los niveles de proteína fosforilada y total no se vieron alterados respecto la condición control.

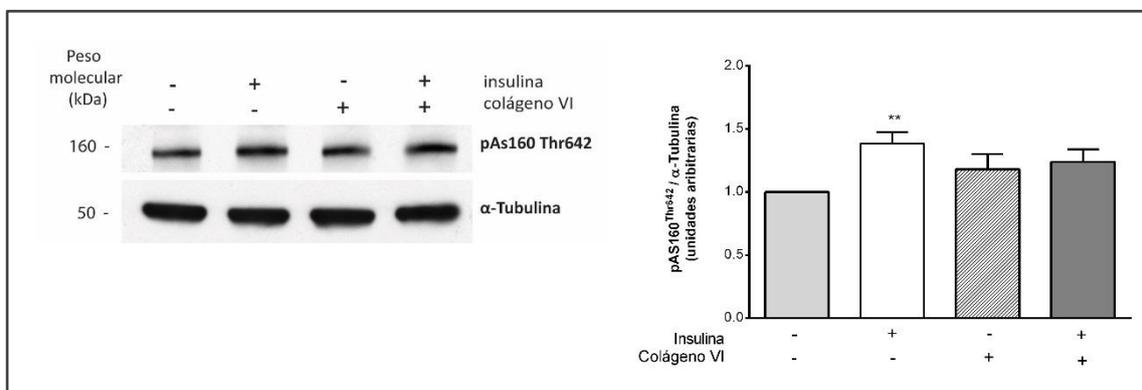
De igual forma se analizó otro de los sustratos de la AKT, la proteína fosforilada AS160 (P-AS160 Thr642) necesaria para la translocación de los transportadores de glucosa a la membrana celular. No se encontraron cambios significativos tras el tratamiento con colágeno VI.



**B**

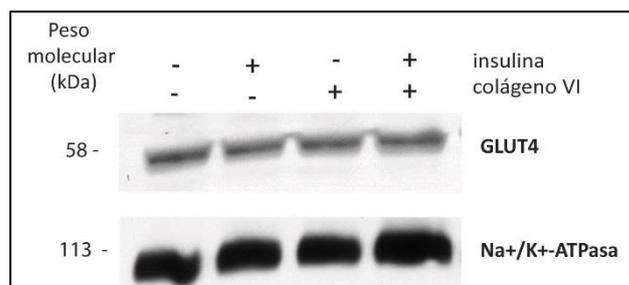


**C**



**Figura 26: Efecto del colágeno VI soluble sobre los niveles totales y la fosforilación de las proteínas Akt, GSK y AS160 en miotubos C2C12.** Cultivos de miotubos C2C12 fueron tratados con o sin 5mg/l de colágeno VI 16 horas y posteriormente con o sin insulina. Los lisados celulares fueron analizados por *Western Blot* con anticuerpos contra Akt, P-Akt (Ser473), GSK3α/β y P-GSK3 α/β (Ser21/9), P-AS160 (Thr642) y α-tubulina como control de carga. El panel muestra una imagen representativa del análisis por *Western Blot* y la media ± error estándar de la densitometría de cuatro experimentos independientes para la detección de Akt (A), GSK3α/β (B) y AS160 (C). Los niveles de cambio para cada proteína se calcularon en relación a la condición basal corregidos por α-tubulina. \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  respecto a la condición basal.

Finalmente, dado que el transportador GLUT4 es el principal transportador de glucosa regulado por insulina en las células musculares y adiposas (Ishiki et al., 2005), se estudiaron sus niveles en extractos proteicos de fracción de membrana de miotubos C2C12. No se pudieron observar cambios significativos en los miotubos tratados con colágeno y tampoco en aquellos estimulados con insulina.

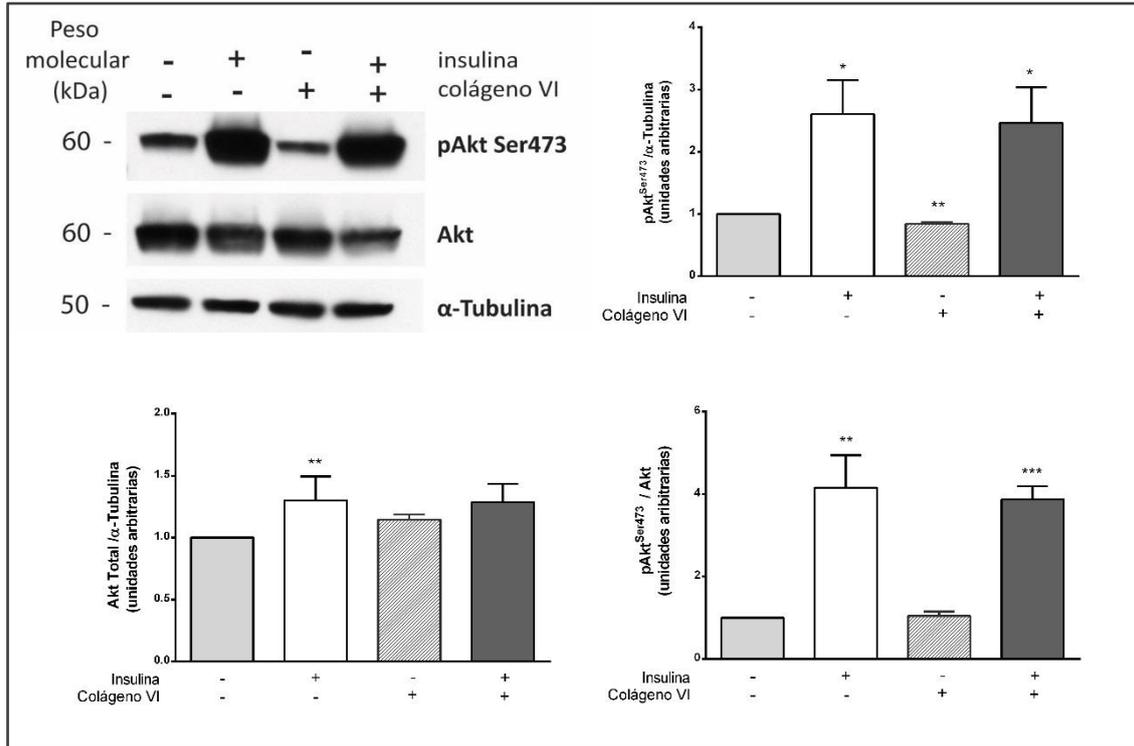


**Figura 27: Efecto del colágeno VI soluble sobre el reclutamiento de transportadores GLUT4 en miotubos C2C12.** Cultivos de miotubos C2C12 fueron tratados con o sin 5mg/l de colágeno VI 16 horas y posteriormente con o sin insulina. Los lisados celulares pertenecientes a la fracción de membrana plasmática fueron analizados por *Western Blot* con anticuerpos contra GLUT4 y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa como control de carga. El panel muestra una imagen representativa del análisis por *Western* de un solo experimento para la detección de GLUT4.

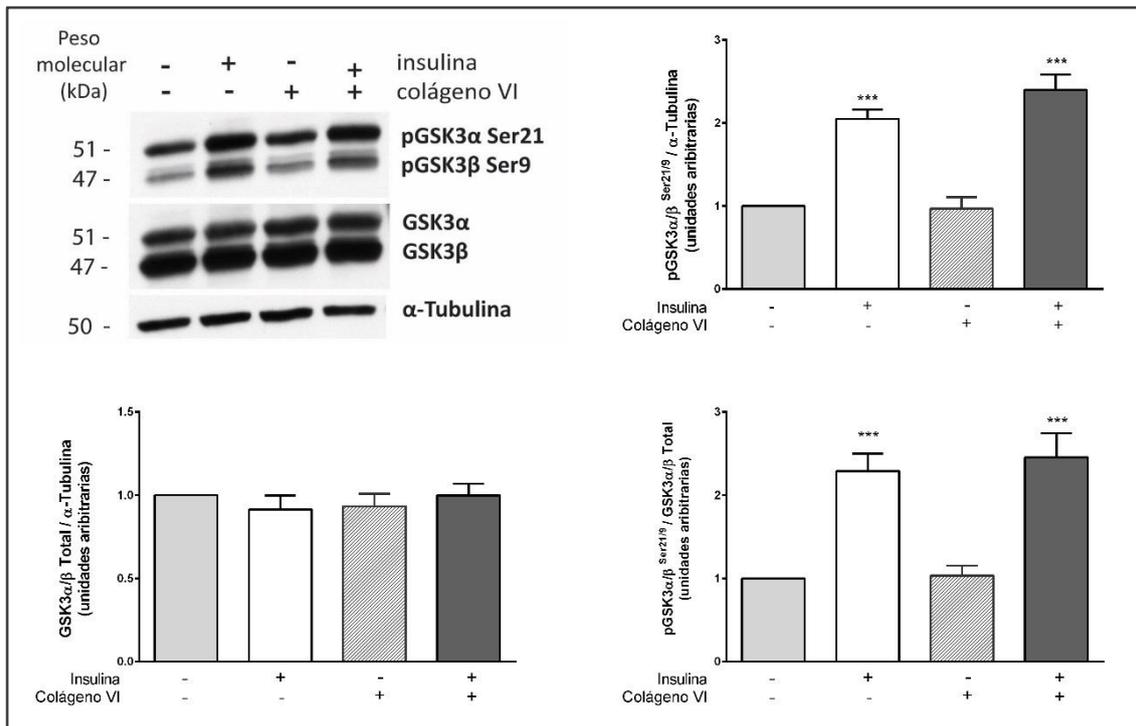
Los mismos sustratos fueron estudiados en adipocitos de la línea 3T3-L1. Los niveles de la proteína AKT fosforilada, se encontraban reducidos significativamente al someter los adipocitos a un tratamiento de 16 horas con colágeno VI, mientras que los niveles de proteína total aumentaron respecto la condición basal, aunque no de manera significativa. La ratio entre AKT fosforilada y AKT total tras el tratamiento con colágeno VI no resultó significativamente distinta a la misma ratio para la condición basal.

En cuanto a la proteína fosforilada GSK3, en este caso no se detectaron cambios significativos entre la condición con colágeno VI y la condición basal. Tampoco hubo cambios en los niveles totales de la proteína después del tratamiento con colágeno VI.

A



B



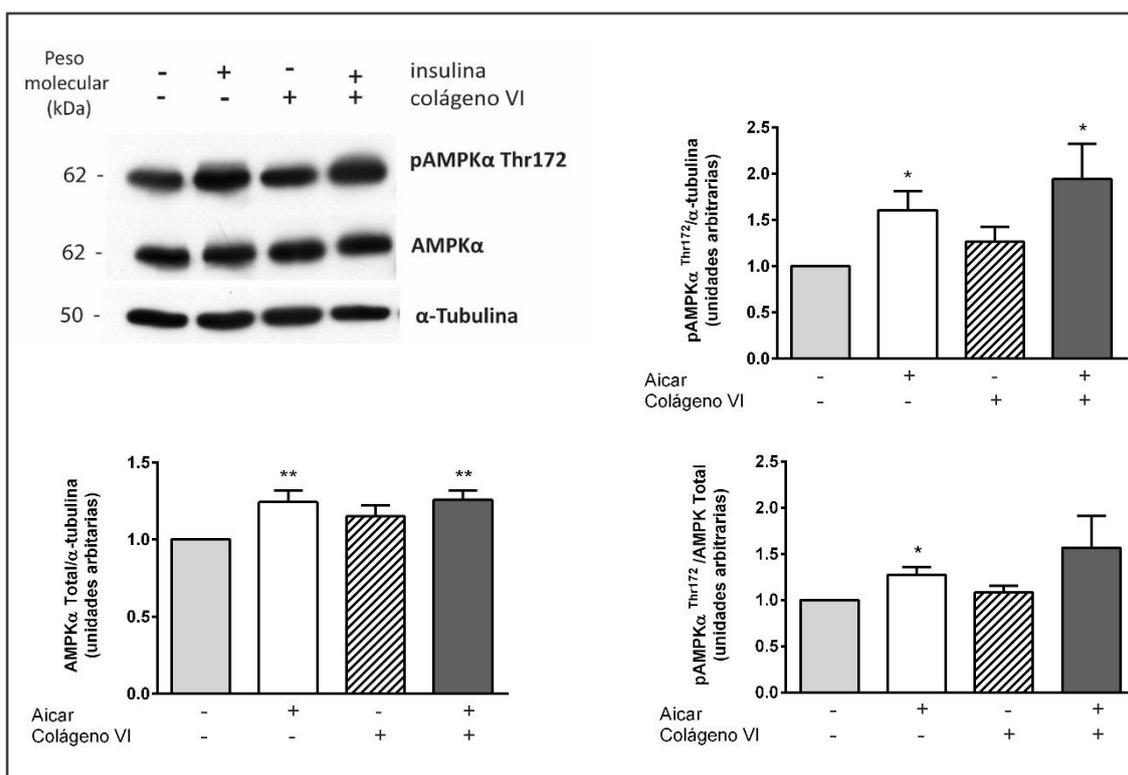
**Figura 28: Efecto del colágeno VI soluble sobre los niveles totales y la fosforilación de las proteínas Akt y GSK en adipocitos 3T3-L1.** Cultivos de adipocitos 3T3-L1 fueron tratados con o sin 5mg/l de colágeno VI 16 horas y posteriormente con o sin insulina. Los lisados celulares fueron analizados por *Western Blot* con anticuerpos contra Akt, P-Akt (Ser473), GSK3α/β y P-GSK3 α/β (Ser21/9) y α-tubulina como control de carga. El panel muestra una imagen representativa del análisis por *Western Blot* y la media ± error estándar de la densitometría de cuatro experimentos independientes para la detección de Akt (A) y GSK3α/β (B). Los niveles de cambio para cada proteína se calcularon en relación a la condición basal corregidos por α-tubulina. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  y \* $P < 0,001$  respecto la condición basal.

### 4.2.3 Efecto del colágeno VI en la vía de señalización AMPK

Además de la vía promotora de la captación de glucosa dependiente de la insulina PI3K/AKT analizada hasta el momento en los experimentos anteriores, se ha descrito un mecanismo independiente a la insulina capaz de estimular la captación de glucosa en el músculo esquelético activado por el ejercicio y el estrés (O'Neill, 2013). Este mecanismo se encuentra mediado por la vía de la proteína quinasa activada por AMP 5' (AMPK).

A fin de investigar la implicación del colágeno VI en la captación de glucosa a través de esta vía, se estudiaron los niveles de fosforilación de la proteína AMPK (P-AMPK Thr172) en las células C2C12 tratadas con colágeno VI y AICAR, un análogo de AMP que estimula la actividad AMPK, que sirvió como control positivo.

Aunque los niveles de proteína AMPK fosforilada se mostraron ligeramente aumentados tras el tratamiento con colágeno VI, estos cambios no llegaron a ser significativos.



**Figura 29: Efecto del colágeno VI soluble sobre los niveles totales y la fosforilación de AMPK en miotubos C2C12.** Cultivos de miotubos C2C12 fueron tratados con o sin 5mg/l de colágeno VI 16 horas y posteriormente con o sin 1mM de AICAR durante 15 minutos. Los lisados celulares fueron analizados por *Western Blot* con anticuerpos contra AMPK, P-AMPK (Thr172) y  $\alpha$ -tubulina como control de carga. El panel muestra una imagen representativa del análisis por *Western Blot* y la media  $\pm$  error estándar de la densitometría de cuatro experimentos independientes. Los niveles de cambio para cada proteína se calcularon en relación a la condición basal corregidos por  $\alpha$ -tubulina. \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  respecto a la condición basal.

### 4.3 Estado de componentes de las vías PI3K/AKT y AMPK en biopsias musculares de pacientes con mutaciones de colágeno VI

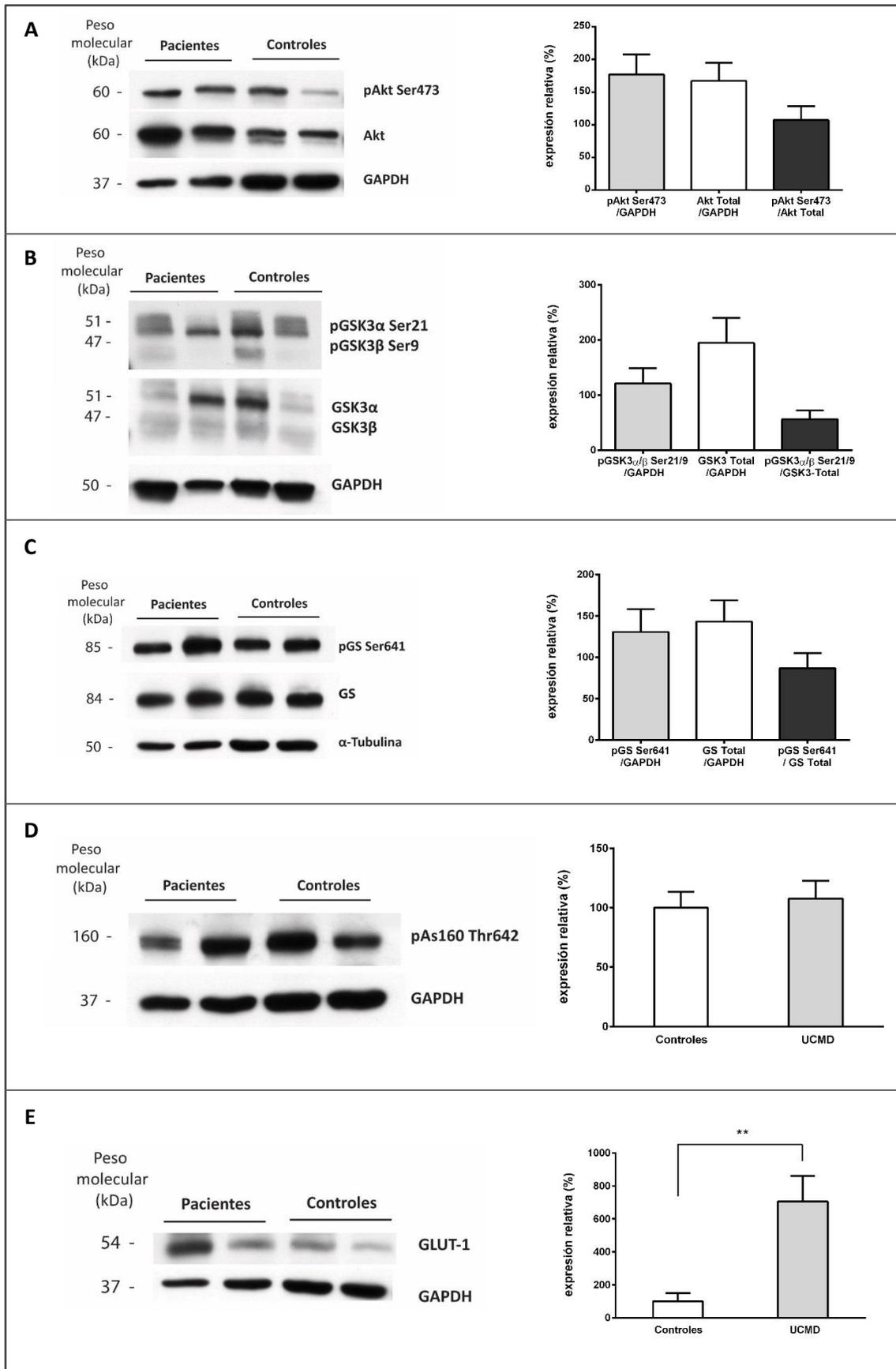
Los pacientes con UCMD, la forma clínica más severa resultado de mutaciones en genes que codifican para colágeno VI, suelen presentar una clara reducción de la expresión de la proteína tal y como se observa en el marcaje por inmunofluorescencia de los fibroblastos productores de colágeno VI y en las biopsias musculares de los pacientes (**Figura 8** del apartado Introducción). Para evaluar el efecto *in vivo* de un déficit parcial de colágeno VI en las vías de señalización PI3K/Akt y AMPK, estudiadas anteriormente en células en cultivo, se estudió la fosforilación y el contenido total de las proteínas implicadas en las vías mencionadas en muestras de músculo esquelético de pacientes UCMD en relación con músculos controles.

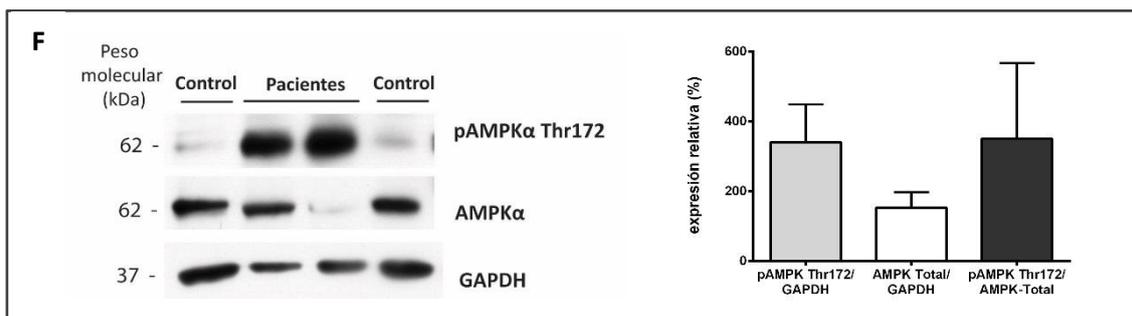
La proteína fosforilada Akt se encontró aumentada en el músculo de pacientes, así como el contenido total de la proteína, aunque en ninguno de los dos casos este aumento resultó significativo. Por otro lado, los niveles totales de proteína GSK3 también se mostraron aumentados sin llegar al valor de significación estadística. El análisis de la proteína GS, tanto en la forma fosforilada como la total, no reveló cambios significativos entre los pacientes y los controles, aunque se vio un leve aumento en los niveles de expresión de ambas formas de la proteína.

Otro efector de la vía PI3K/Akt implicado en la captación de glucosa que se estudió fue la proteína AS160 fosforilada. Prácticamente no se detectaron cambios en los niveles de AS160-P en el músculo de los pacientes. En cuanto a los niveles del transportador de glucosa GLUT1, presentó unos niveles de expresión significativamente superiores en las muestras de músculo de pacientes en comparación con los controles ( $P=0,0099$ ).

Finalmente se analizó el estado de fosforilación y la cantidad de proteína total de AMPK. Se observó un marcado aumento de la fosforilación en muestras de pacientes, aunque no resultó significativo.

# RESULTADOS CAPÍTULO 1





**Figura 30: Expresión de proteínas y la fosforilación de moléculas implicadas en la captación de glucosa dependiente e independiente de insulina en UCMD.** Extractos de proteína total obtenidos a partir de biopsias musculares de músculo de pacientes UCMD (n=6) y controles (n=6) fueron analizados por WB contra las formas totales y fosforiladas de Akt, GSK3α/β, GS, y AMPK, contra P-AS160 y GLUT1. Los paneles de la izquierda muestran una imagen representativa de WB y los paneles de la derecha las densitometrías de la proteína con los valores representados como la media ± SEM. Los niveles de cambio para cada proteína se calcularon en relación a la condición basal corregidos por GAPDH \* $P < 0,05$  respecto a la media de los controles.

#### 4.4 Papel del colágeno VI en la regulación génica

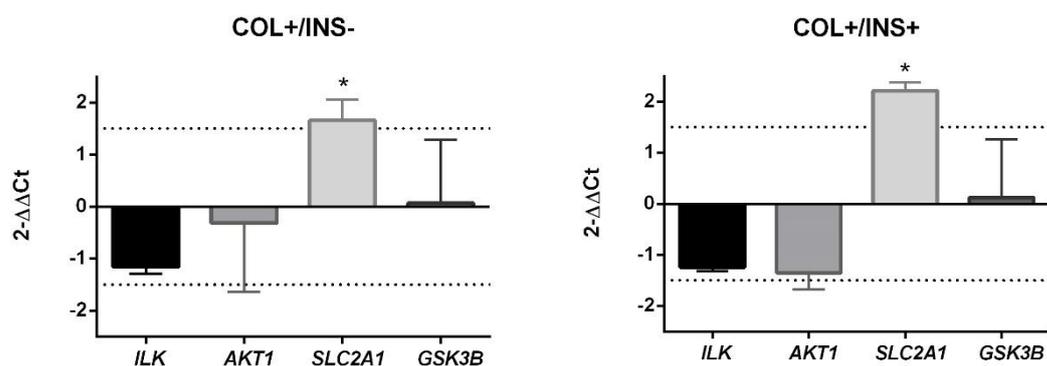
##### 4.4.1 Efecto del colágeno VI en la regulación de la expresión de genes implicados en la vía PI3K/AKT

Con el objetivo de evaluar si los cambios observados en los niveles de proteína total y fosforilada tras el tratamiento con colágeno VI tenían su origen en cambios de expresión en los genes codificantes para las proteínas estudiadas se midieron sus valores de expresión por PCR en tiempo real en miotubos C2C12 y LHCN-M2 tratados con colágeno VI durante el mismo tiempo y a la misma concentración que los usados para los estudios de Western blot mostrados anteriormente.

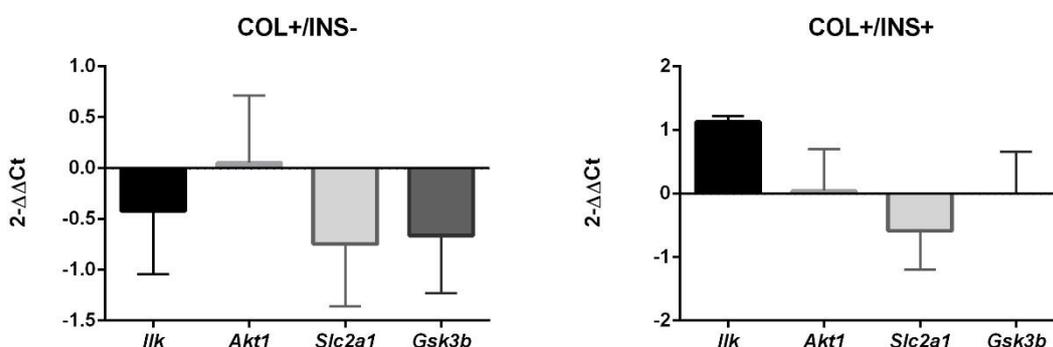
Los resultados nos mostraron un aumento significativo de la expresión del gen *Slc2a1* que codifica para la proteína transportadora de glucosa GLUT1, en los miotubos LHCN-M2 tratados con colágeno VI tanto como único tratamiento (+1,66) como en combinación con insulina (+2,21) respecto a la condición basal sin tratamiento con colágeno o insulina.

Al contrario, como se puede observar en la **Figura 31**, los miotubos C2C12 no presentaron cambios significativos en la expresión de ninguno de los genes estudiados cuando fueron tratados con colágeno VI.

A



B



**Figura 31: Expresión de genes implicados en la vía PI3K/AKT inducidos por colágeno VI en miotubos LHCN-M2 y C2C12.** Los miotubos LHCN-M2 y C2C12 en cultivo fueron tratados con 5mg/l de colágeno VI soluble durante 16 horas. Posteriormente se trataron con 100nM de insulina durante 20 minutos, se aisló el ARN y se llevó a cabo una qRT-PCR para cuantificar el ARNm utilizando sondas específicas “Taq<sup>®</sup>Man Gene Expression” para los genes *ILK*, *AKT1*, *SLC2A1* y *GSK3B* en la línea humana LHCN-M2 (A) y sus homólogos en la línea de ratón C2C12 (B). Los niveles de expresión se normalizaron para el gen TATA box binding protein (*TBP*). Los cambios se expresan como los valores promedio de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  o  $-1 / 2^{-\Delta\Delta Ct}$  en relación a los controles de cuatro experimentos independientes. Un cambio por encima o por debajo de 1,5 fue considerado significativo y se indica con \*.

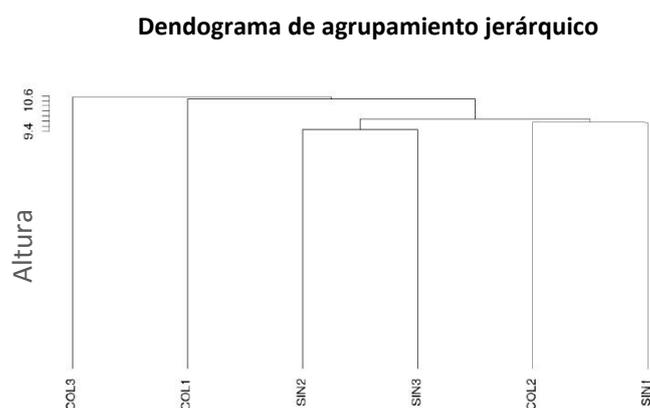
#### 4.4.2 Estudio de Microarrays

Los resultados obtenidos hasta el momento nos mostraron un efecto positivo del colágeno VI en la captación de glucosa y síntesis de glucógeno así como cambios en los niveles totales de las proteínas AKT y GSK tras 16 horas de exposición. El periodo de tratamiento al que se observaron estos cambios significativos es suficientemente largo como para promover cambios de expresión génica en las células tratadas. Estos cambios de expresión variaran en función de factores clave como el gen estudiado, la dosis de tratamiento usada así como el tipo celular.

Con el objetivo de adquirir una amplia visión del efecto del colágeno VI en la regulación de la expresión de genes que conduzcan, entre otros efectos, al aumento observado en la captación de glucosa, se realizó un análisis global de la expresión génica mediante microarrays. Para ello se comparó el transcriptoma de miotubos C2C12 tratados con 5mg/l de colágeno VI soluble durante 16 horas con el de miotubos C2C12 no tratados.

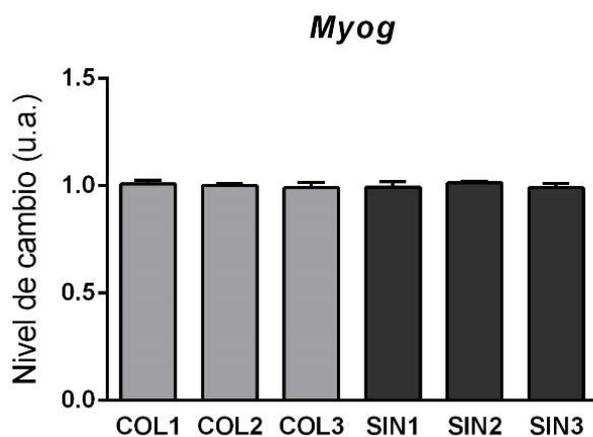
Primeramente se realizó un análisis no supervisado de *clustering* o agrupamiento jerárquico. Este análisis consiste en agrupar las muestras de la matriz de expresión obtenida del estudio de microarrays en grupos (*clusters*) anidados mediante el cual los grupos con patrones de expresión similares se conectaron por una serie de ramas que representaron la relación entre dichos grupos tal y como podemos ver representado en forma de dendograma en la **Figura 32**.

Los resultados de este primer estudio de agrupación mostraron una alta heterogeneidad entre las réplicas de un mismo grupo, siendo el grupo tratado con colágeno VI es más variable



**Figura 32: Dendograma de agrupamiento jerárquico.** Se representan las jerarquías de grupos basadas en los niveles de expresión de los genes analizados para cada una de las tres muestras perteneciente al grupo tratado (COL) y el grupo sin tratar (SIN). Las muestras COL3 y COL1 se agrupan de manera parecida, mientras que la muestra COL2 muestra un patrón de expresión más parecido a las muestras del grupo SIN.

Para descartar que la causa de esta variabilidad fuera una diferenciación discordante entre muestras, se evaluó mediante PCR en tiempo real el nivel de expresión del gen marcador de diferenciación miogénica *Myog* en cada una de las muestras. No se obtuvieron diferencias significativas entre los niveles de expresión de *Myog* en las muestras tratadas y las no tratadas, el nivel de expresión en las seis muestras fue muy parecido tal y como se puede apreciar en la **Figura 33**.

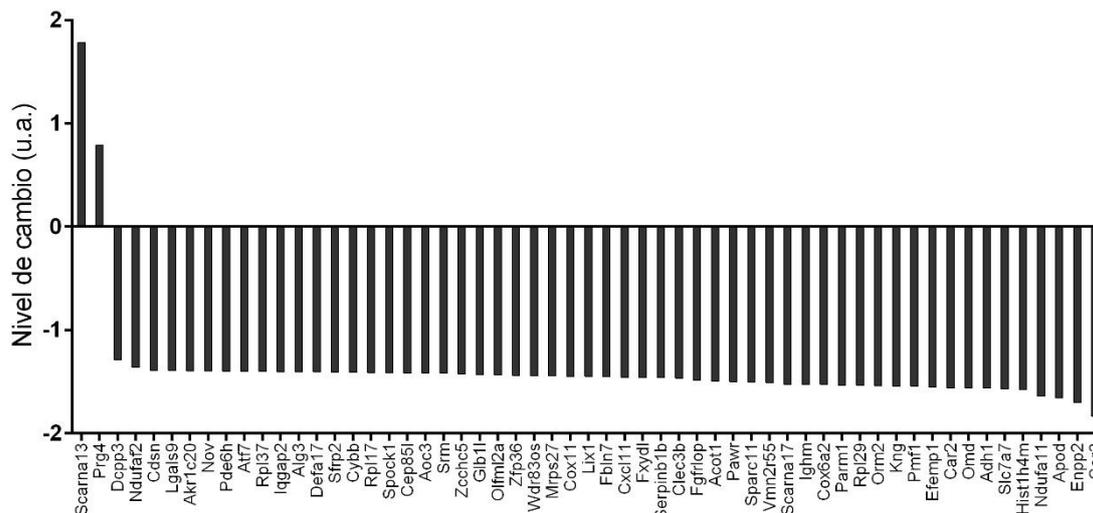


**Figura 33: Expresión del gen *Myog* en las muestras utilizadas para el estudio de microarray.** Los miotubos C2C12 en cultivo fueron tratados con 5mg/l de colágeno VI soluble durante 16 horas. Posteriormente se aisló el ARN y se llevó a cabo una qRT-PCR para cuantificar el ARNm utilizando sondas específicas “Taq<sup>®</sup>Man Gene Expression” para el gen *Myog*. Los niveles de expresión se normalizaron para el gen TATA box binding protein (*Tbp*). Los cambios se expresan como los valores promedio  $\pm$  SEM de los valores CT de los duplicados de cada muestra.

A continuación, se realizó un análisis estadístico supervisado con el método RankProd. Mediante este método estadístico no paramétrico pudimos detectar los genes que se encontraban entre los más diferencialmente expresados en las réplicas de nuestras dos condiciones basándonos en la clasificación de los *fold change* de los genes estudiados y aplicando el criterio de selección  $q < 0,05$ . Se identificaron 56 sondas diferencialmente expresadas de las cuales, solo a 4 se pudieron asignar los correspondientes genes anotados, el resto de sondas correspondían a secuencias del genoma no codificantes.

Debido a la leve abundancia de genes cuya expresión se encontró alterada de manera significativa, se realizó un segundo análisis de los datos. Este análisis consistió en aplicar a los datos un filtro mediante el cual se eliminaron del análisis genes putativos, SNORs (*Small Nucleolar RNA* en inglés), pseudogenes, micro ARNs y los genes que codifican las proteínas ribosomales con el objetivo de descartar todos aquellos factores que podían entorpecer el estudio e interpretación de los resultados originales. Así mismo, se aumentó el límite del valor de significación a  $q < 0,1$  y se eliminó una de las réplicas del grupo tratado debido a su alta similitud con el grupo control y su dispersión respecto el grupo tratado al que pertenecía.

De este segundo análisis se lograron 57 genes codificantes diferencialmente expresados, la mayoría de ellos se encontraron regulados negativamente en las muestras tratadas con colágeno VI y sólo dos estaban regulados positivamente (**Figura 34**).



**Figura 34: Niveles de cambio de expresión génica en miotubos tratados con colágeno VI relativos a los niveles de expresión de miotubos no tratados.** Los miotubos C2C12 en cultivo fueron tratados con 5mg/l de colágeno VI soluble en medio de depleción durante 16 horas (n=3) o mantenidos en medio de depleción para servir como controles (n=3). Posteriormente se aisló el ARN y se llevó a cabo un análisis transcriptómico mediante GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array. En la gráfica se representan aquellos genes cuya expresión apareció significativamente alterada tras el segundo análisis con RankProd  $q < 0,1$  en las muestras tratadas con colágeno VI respecto las no tratadas. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (u.a.) referentes a la magnitud del cambio del ARNm de las muestras tratadas respecto las no tratadas.

Entre los seis principales genes expresados de manera diferencial entre las muestras tratadas y las no tratada, se encontró sobrepresado 0,791 veces en las muestras tratadas el gen *Prg4*, que codifica para la proteína de la matriz extracelular proteoglicano 4. También el gen *Scarna13*, codificante para un ARN nucleolar pequeño que guía modificaciones de otros ARN, se encontró sobrepresado 1,783 veces.

En referencia a los genes que presentaron mayor disminución de su expresión en el grupo tratado respecto el no tratado, encontramos en primer lugar la enzima anhidrasa carbónica 3 (*Car3*) disminuida 1,835 veces. En segundo lugar, encontramos disminuido 1,701 veces, el gen *Enpp2* que codifica la enzima fosfodiesterasa 2. Y en tercer lugar, disminuido 1,657 veces, el gen *Apod* codificante para la apolipoproteína D. Además el gen *Ndufa11* codificante para la enzima deshidrogenasa NADH también apareció disminuido 1.641 veces en los miotubos tratados con colágeno VI.

La base de datos Ingenuity Pathway Analysis se usó para realizar el análisis d enriquecimiento funcional como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.6.5 de Materiales y métodos con el objetivo de hallar el significado biológico de los resultados obtenidos. Por medio del análisis



tendencia se mostró variable entre las muestras de un mismo grupo cuando se estudiaron los valores individualmente para cada muestra del grupo tratado como se observa en la siguiente tabla.

	PCR en tiempo real				Microarray
	COL1	COL2	COL3	PROMEDIO	PROMEDIO
<b><i>Ndufa11</i></b>	1,041	1,004	-1,011	0,345	-1,641
<b><i>Cox6a2</i></b>	-1,064	-1,256	-1,056	-1,125	-1,529
<b><i>Cox11</i></b>	1,116	1,082	1,242	1,147	-1,447
<b><i>Nufaf2</i></b>	1,013	1,035	1,174	1,074	-1,363
<b><i>Mrps27</i></b>	-1,042	1,117	1,107	0,394	-1,443

**Tabla 9: Comparación de los niveles de expresión génica obtenidos por PCR en tiempo real y por microarray en mitobubos C2C12 tratados con colágeno VI soluble.** Los niveles de expresión por PRC a tiempo real de los genes *Ndufa11*, *Cox6a2*, *Cox11*, *Nufaf2* y *Mrps27* se representan como valor absoluto referente a la magnitud del cambio del mRNA de cada gen estudiado respecto el mRNA de *Hprt1*. Los valores absolutos de calcularon a partir de la media de  $2^{-\Delta\Delta^{CT}}$  o  $-1/2^{-\Delta\Delta^{CT}}$  de las tres muestras tratadas en relación a la expresión de los mismos genes en los miotubos control no tratados con colágeno VI. Los valores absolutos de expresión de los genes *Ndufa11*, *Cox6a2*, *Cox11*, *Nufaf2* y *Mrps27* medidos por microarray en los miotubos tratados con colágeno VI se calcularon en relación a la expresión de los genes en los miotubos controles y como se detalló en el apartado 3.6.4 de materiales y métodos.

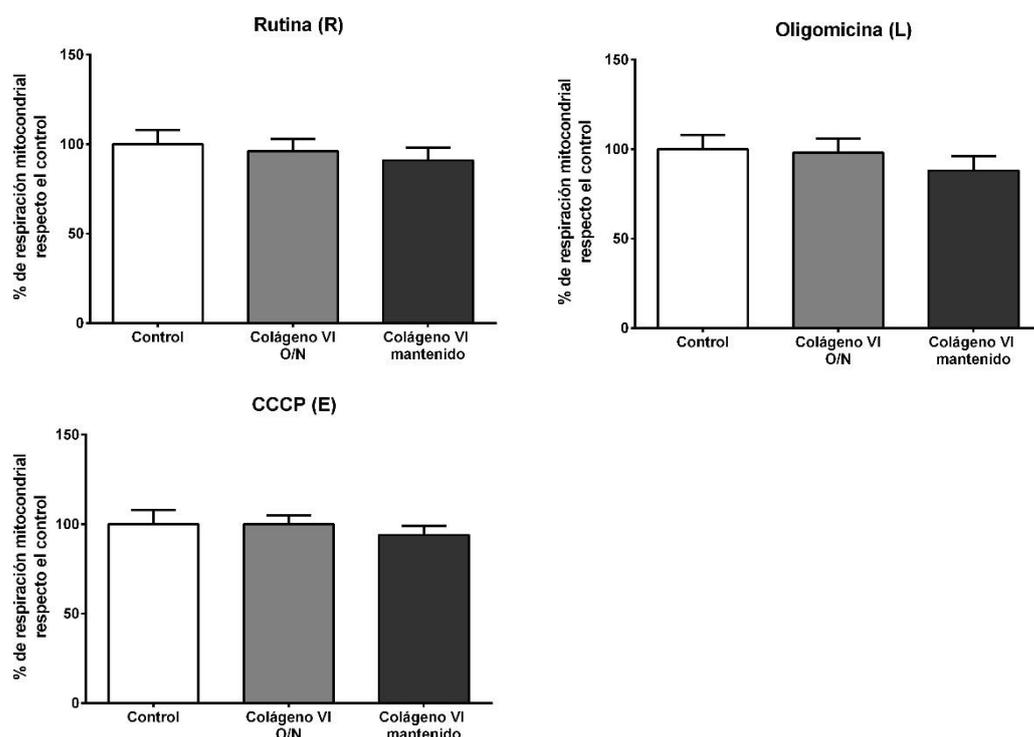
El único gen que mantuvo la tendencia a la baja en todas las muestras tratadas con colágeno VI, tal y como se observó en el estudio por microarray, fue el gen *Cox6a2*. Por el contrario, los genes *Cox11* y *Ndufaf2* revelaron un pequeño aumento en su expresión en las muestras tratadas mientras que en el microarray su expresión se encontró disminuida. La cuantificación del gen *Mrps27* por PCR en tiempo real mostró una reducción en la muestratratada COL1 y las muestras COL2 y COL3 presentaron un aumento de la expresión. El gen *Ndufa11* por su parte, mostró un leve aumento en su expresión en las muestras tratadas COL1 y COL2 y una ligera disminución en la muestra COL3.

#### 4.5 Estudio de los efectos del colágeno VI en la tasa de consumo de oxígeno

De acuerdo con los resultados de expresión génica del apartado anterior, los miotubos C2C12 tratados con colágeno VI sufren cambios de expresión en genes que forman parte del proceso de fosforilación oxidativa. Con tal de medir el impacto del colágeno VI en el metabolismo a través de alteraciones en la cadena respiratoria se realizaron cinco determinaciones independientes

del consumo de oxígeno (OCR, de *oxygen consumption rate* en inglés) en miotubos C2C12 utilizando el *XF24 Extracellular Flux Analyser* (Seahorse Bioscience) tal y como se describe en el apartado 3.7.3 de Materiales y métodos.

Los valores de respiración mitocondrial obtenidos en los diferentes estados nos indicaron, tal y como se puede apreciar en la **Figura 36** que hubo una disminución de la respiración en estado de rutina del 4% en los miotubos tratados con una sola dosis O/N de colágeno VI y una disminución del 9% en aquellos tratados de manera ininterrumpida durante el ensayo. Al inhibir el complejo V mediante el tratamiento con oligomicina se observó una reducción de la respiración respecto el control del 2% y del 12% en los miotubos tratados O/N y de manera continuada con colágeno VI respectivamente. Por lo que respecta a la capacidad máxima respiración mitocondrial (E) vemos que no se vio afectada después del tratamiento O/N de colágeno VI mientras que tras el tratamiento continuado sufrió un leve descenso del 6%. Ninguno de estos cambios resultaron significativos por lo que no parecía que el colágeno VI afectara a la capacidad respiratoria de la mitocondria.

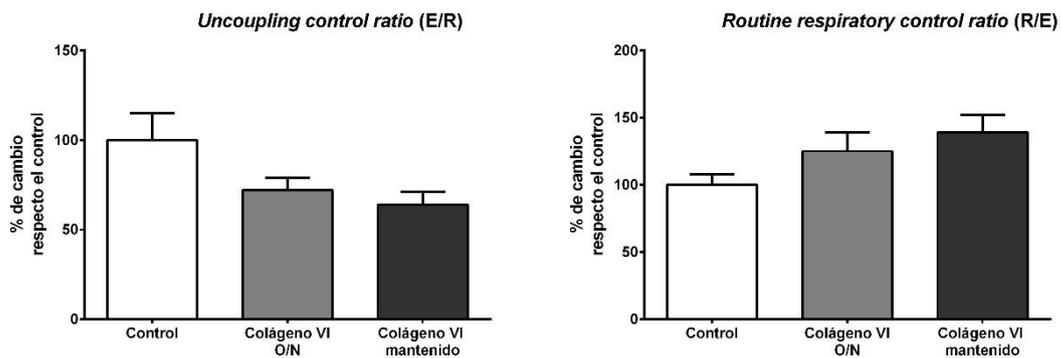


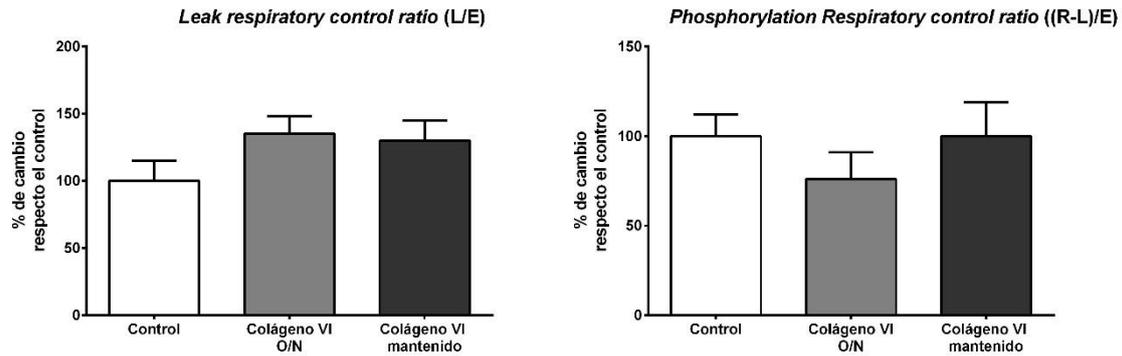
**Figura 36: Efecto del colágeno VI sobre el consumo de oxígeno mitocondrial en miotubos C2C12.** (A) Las células C2C12 fueron tratadas con 5mg/l de colágeno VI soluble añadido en el medio durante 16 horas. Las determinaciones de O<sub>2</sub> se realizaron el día siguiente en las células controles y las tratadas, de las cuales, la mitad recibió una segunda dosis de 5mg/l de colágeno VI durante el tiempo que duró el ensayo. Los valores de R;L y E de respiración mitocondrial se obtuvieron al restar el valor de la respiración no mitocondrial (rox) a la tasa respiratoria absoluta en los estados de rutina (R-rox), *proton leak* (L-rox) y la capacidad máxima del sistema de transporte de protones (E-rox). Los datos corresponden a la media ± error estándar de 5 experimentos independientes expresada en relación a la condición de rutina.

A partir de los valores obtenidos de consumo de oxígeno mitocondrial se calcularon las *Flux Control Ratio* para entender el origen de las tendencias de los cambios observados en los distintos estados de respiración mitocondrial.

Cuando se estudió la ratio *Uncoupling control ratio* (E/R), la cual nos indica la capacidad de reserva que tienen las células, se observó una disminución del 28% tras el tratamiento O/N de colágeno VI, mientras que con el mantenimiento del tratamiento durante todo el ensayo, esta disminución llegó a ser del 36%, los cambios no resultaron estadísticamente significativos. Por el contrario, cuando se calculó la ratio *Routine respiratory control ratio* (R/E) se apreció una tendencia a la utilización de un mayor porcentaje (25% respecto el control) de la capacidad respiratoria máxima en rutina por parte los miotubos tratados O/N, siendo mayor la tendencia en los miotubos que recibieron la dosis ininterrumpida de colágeno VI (39% respecto el control). Para estudiar qué porcentaje de esta capacidad máxima utilizada está ligado a la producción de ATP se calculó el *Phosphorylation Respiratory control ratio* ((R-L)/E) que apareció disminuida (24% respecto el control) en los miotubos tratados con una dosis O/N de colágeno VI e inalterada en aquellos tratados durante todo el ensayo. Pese a estos cambios, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

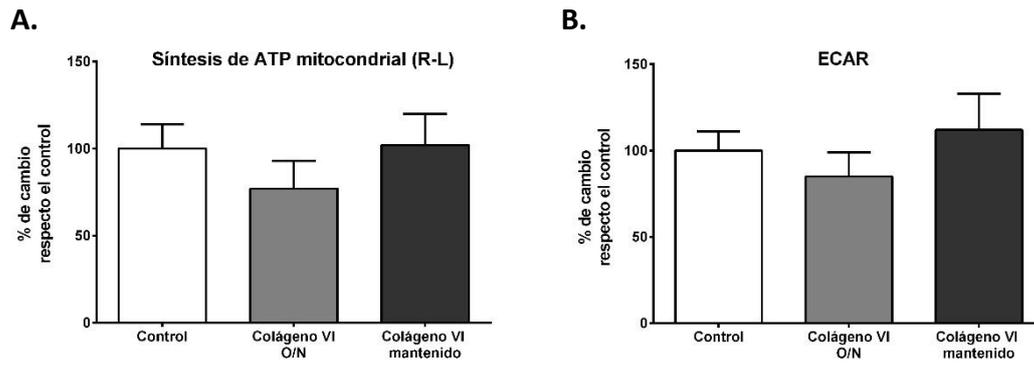
En el caso de la *Leak respiratory control ratio* (L/E), los miotubos tratados con colágeno VI también presentaron valores aumentados respecto el control, aunque en este caso, el *proton leak* fue mayor en los miotubos tratados O/N con colágeno VI que aquellos tratados ininterrumpidamente (35% y 30% respectivamente respecto el control).





**Figura 37: Efecto del colágeno VI sobre las Flux Control Ratios en miotubos C2C12.** (A) A partir de los valores de respiración mitocondrial expresados en la Figura 36 se calcularon las ratios *Uncoupling control ratio* (E/R), *Routine respiratory control ratio* (R/E), *Respiratory control ratio* (L/E) y *Phosphorylation respiratory control ratio* ((R-L)/E). Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 5 experimentos independientes expresada en relación a la condición de rutina.

Junto a las determinaciones de O<sub>2</sub>, el aparato el XF24 *Extracellular Flux Analyser* es capaz de medir en paralelo los niveles de pH. Esto nos permitió estudiar el flujo glicolítico en miotubos tratados con colágeno VI en el estado de rutina mediante la medición de la acidificación del medio celular (ECAR del inglés *extracellular acidification rate*) y correlacionarlo con el consumo de oxígeno mitocondrial destinado a la síntesis de ATP (R-L). Podemos ver que aunque el consumo de oxígeno destinado a la producción de ATP se encuentra reducido en los miotubos tratados con una dosis de colágeno VI (27,5% menor al control), este no fue compensado por la glicólisis ya que el flujo glicolítico no se vio aumentado y fue un 14,6% menor que en el control. En el caso de los miotubos tratados con dos dosis de colágeno VI, consumo de oxígeno destinado a la producción de ATP se incrementó en un 2,2% y un 17,2% el flujo glicolítico. Estos cambios no resultaron significativos.



**Figura 38: Relación del efecto del colágeno VI en el consumo de oxígeno destinado a la síntesis mitocondrial y el flujo glicolítico en miotubos C2C12. (A)** Valores de consumo de  $O_2$  mitocondrial ( $\text{pmolO}_2/\text{min}$  por  $\mu\text{g}$  de proteína) destinado a la síntesis de ATP calculado a partir de la diferencia en el consumo de oxígeno mitocondrial en el estado de rutina (R) y el *proton leak* (L) **(B)** Valores de ECAR ( $\text{mpH}/\text{min}$  por  $\mu\text{g}$  de proteína) en rutina. Los datos corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 5 experimentos independientes.



## **CAPÍTULO 2**

---



## **5 RESULTADOS CAPÍTULO 2**

---



## 5.1 Estudio de la composición corporal de pacientes con miopatías relacionadas con déficits en colágeno VI.

### 5.1.1 Cambios en la cantidad y distribución de masa grasa

Como anteriormente se describió, el colágeno VI se encuentra altamente expresado en la matriz extracelular que rodea el adipocito. Sin embargo, las alteraciones en el tejido adiposo que podrían resultar de este déficit de colágeno VI han sido menos exploradas hasta el momento.

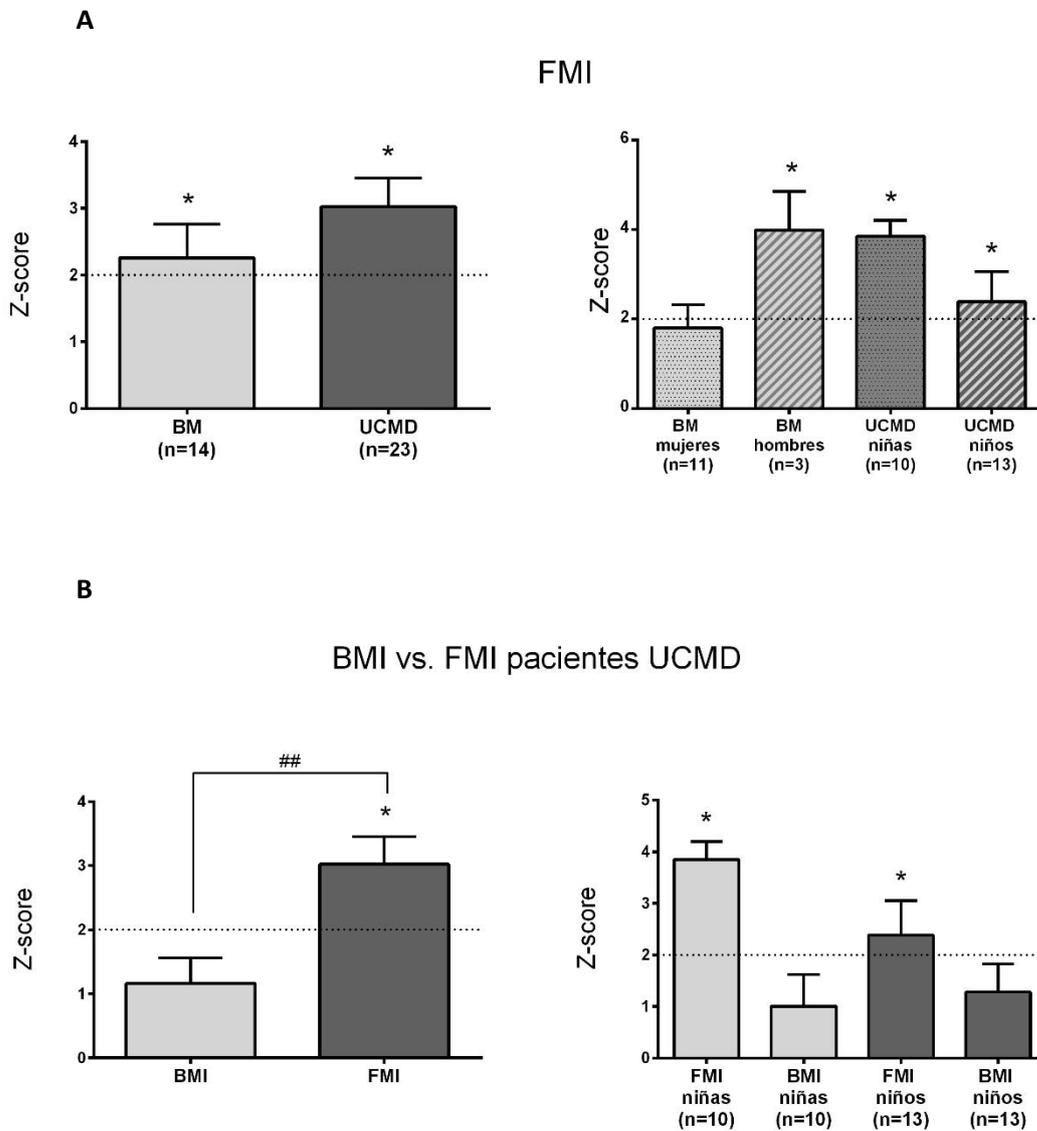
Con el objetivo de valorar los cambios de composición corporal en los pacientes con déficits de colágeno VI, se estudió la cantidad de tejido adiposo mediante Absorciometría de doble energía (DXA). A partir de los valores obtenidos se calcularon una serie de parámetros que nos informaron de la cantidad y distribución de tejido adiposo en comparación con controles para la misma edad y sexo tal y como se detalló en el apartado 3.8 de Materiales y métodos.

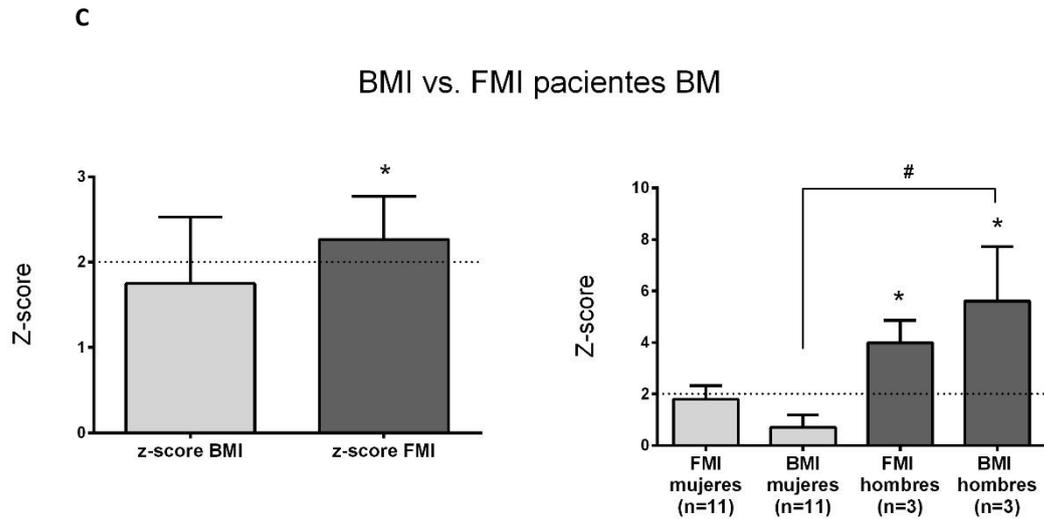
Se examinó la cantidad total de masa grasa y se expresó como FMI (*fat mass index* en inglés). Los resultados mostraron un aumento significativo de la cantidad de masa grasa en ambos grupos de pacientes (BM  $Z$ -score=2,26 y UCMD  $Z$ -score=3,02), sin cambios significativos en relación al sexo en ninguno de los dos grupos. Este aumento de FMI no se correlacionó con cambios significativos en el índice de masa corporal (BMI, *body mass index*, en inglés) en el caso de los pacientes UCMD ( $Z$ -score=1,16). Por el contrario, el aumento del FMI en los pacientes BM sí parecía traducirse en un aumento en el BMI, aunque este no llegó a ser estadísticamente superior al de la población de referencia en el caso de las mujeres ( $Z$ -score=0,69), como tampoco lo fue el FMI ( $Z$ -score=1,80). Por el contrario, en el caso de los hombres, ambos parámetros distaron mucho de los valores medios de la población de referencia (FMI  $Z$ -score=3,99 y BMI  $Z$ -score=5,60) y el BMI resultó significativamente mayor en los hombres que en el grupo de las mujeres ( $P=0,0039$ )

De manera específica en el grupo de pacientes UCMD, la cantidad de grasa presente en el tronco y en la región androide, se situó por encima de la población de referencia con un  $Z$ -score=4,14 y  $Z$ -score=2,55 respectivamente. Los pacientes BM mostraron una tendencia parecida, aunque las diferencias en relación a la población de referencia no fueron significativas ( $Z$ -score=1,82 y  $Z$ -score=1,89). Sin embargo, al estudiar este aumento en los pacientes de cada sexo, se observó que tanto los hombres BM como las niñas UCMD mostraban unos valores muy parecidos y significativamente incrementados respecto la población control y a sus compañeros de sexo opuesto en el caso de BM ( $P$  valor mujeres hombres BM=0,018). Se observó que este patrón de aumento masa grasa en hombres y niñas no solo se limitó a la región androide, el incremento

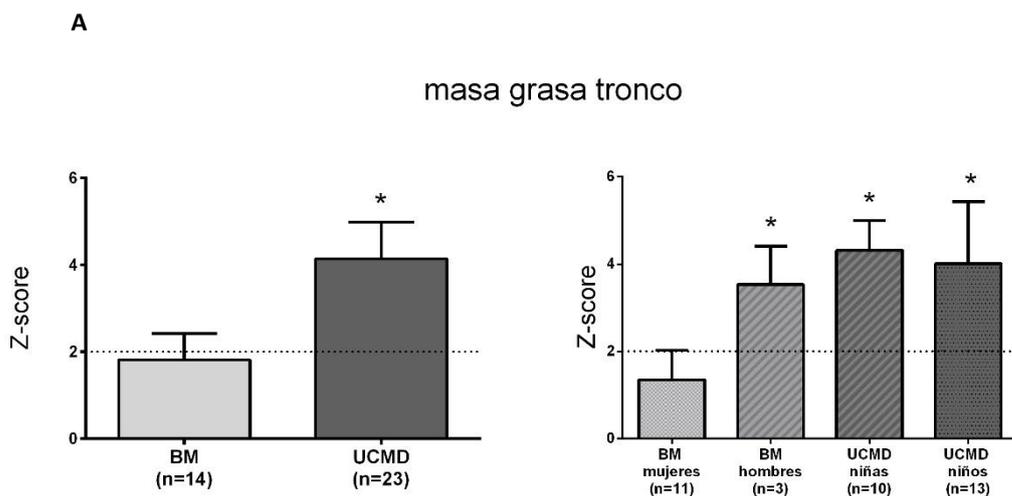
RESULTADOS CAPÍTULO 2

de los depósitos de grasa en las extremidades inferiores observado en las dos tipos de patología (BM  $Z\text{-score}= 2,90$  y UCMD  $Z\text{-score}=3,87$ ) fueron especialmente relevantes en el grupo de hombres BM ( $Z\text{-score}=4,39$ ) y niñas UCMD ( $Z\text{-score}=4,91$ ) con una diferencia significativa en relación al sexo entre pacientes de la misma patología ( $P$  valor mujeres vs. hombres BM $<0,001$  y  $P$  valor niñas vs. niños UCMD=0,024). Asimismo se vio un aumento significativo en los depósitos de grasa en caderas, nalgas y muslos (conocida como distribución ginecoide) en los pacientes BM y UCMD, siendo una vez más llamativo, respecto la población de referencia, para los hombres BM ( $Z\text{-score}=3,73$ ) y la niñas UCMD ( $Z\text{-score}=3,55$ ) así como en relación a sus compañeros de sexo opuesto ( $P$  valor mujeres vs. hombres BM=0,0012 y  $P$  valor niñas vs. niños UCMD=0,0012) (Figura 40).



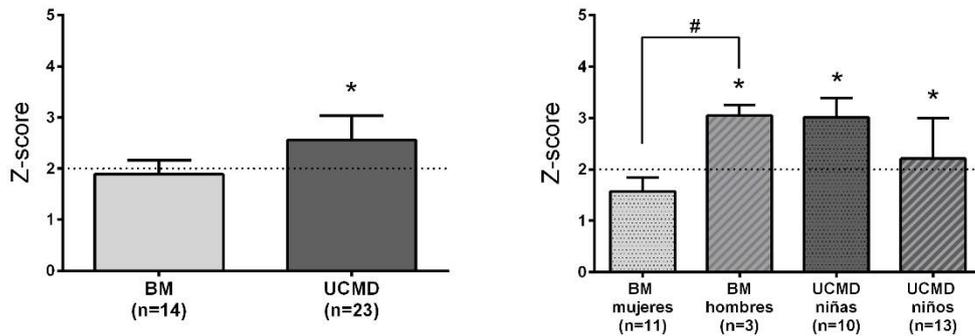


**Figura 40: Cambios de cantidad de grasa corporal en pacientes BM y UCMD: (A) Masa grasa normalizada por la altura al cuadrado (FMI) en relación a los valores de población sana de referencia en pacientes BM y UCMD. Comparación cantidad de masa grasa y índice de masa corporal (BMI) en pacientes UCMD (B) y BM (C) representados conjuntamente o según el sexo. Los resultados se presentan como la media de la puntuación Z-score para cada grupo y el umbral para la significación estadística se representa en las gráficas con la línea discontinua en  $\geq 2$  SD, cuando se supera el umbral se indica con el símbolo \*. El signo positivo o negativo del Z-score indica la dirección de la desviación. \**P* valor<0,05; ##*P* valor<0,01 y ###*P* valor<0,001.**



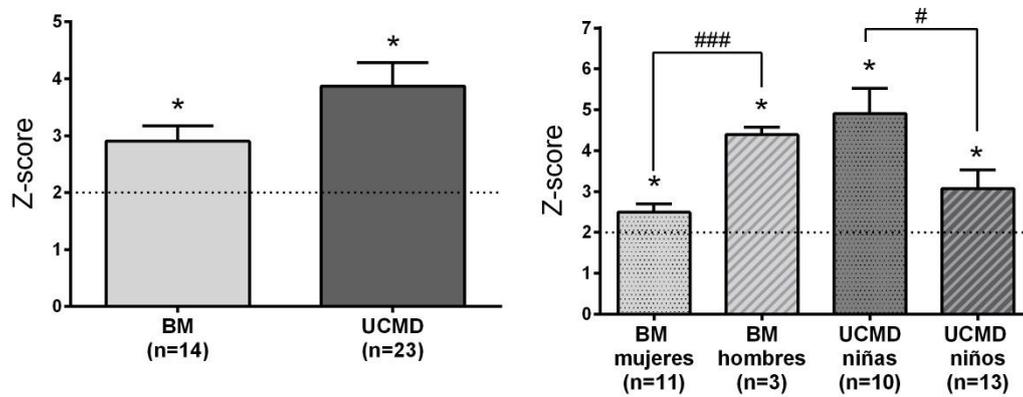
B

masa grasa androide

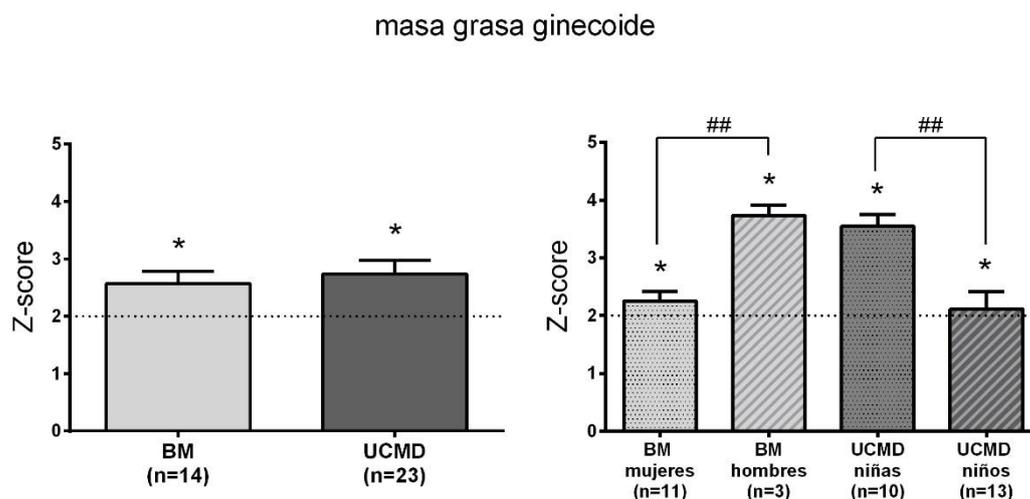


C

masa grasa piernas



D

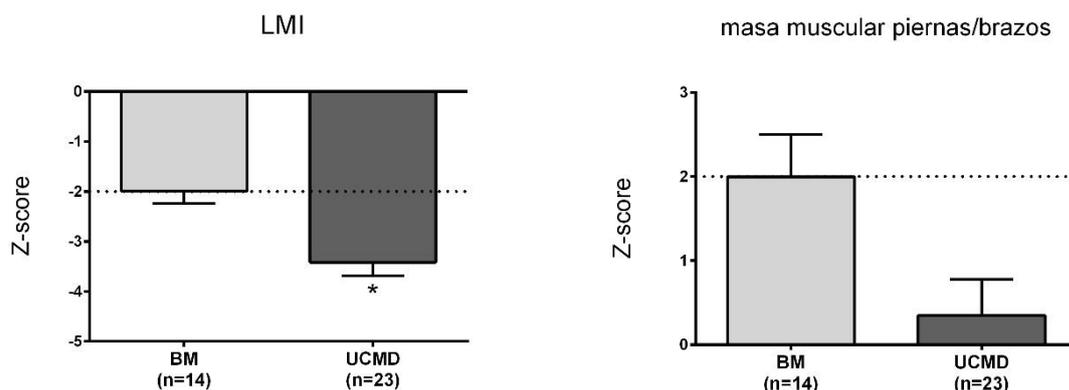


**Figura 41: Cambios de cantidad y distribución de grasa corporal en pacientes BM y UCMD: (A)** Cantidad de masa grasa depositada en el tronco en pacientes BM y UCMD. **(B)** Representación del porcentaje de masa grasa localizada en la región androide en pacientes BM y UCMD, por patología o por sexo, en relación a la población de referencia. **(C)** Porcentaje de masa grasa localizada en las piernas respecto a la población sana en pacientes BM y UCMD, representados conjuntamente o según el sexo. **(D)** Porcentaje de masa grasa ginecoide en relación a controles sanos, en pacientes BM y UCMD expresados en conjunto y por sexo. Los resultados se presentan como la media de la puntuación *Z-score* para cada grupo y el umbral para la significación estadística se representa en las gráficas con la línea discontinua en  $\geq 2$  SD, cuando se supera el umbral se indica con el símbolo \*. El signo positivo o negativo del *Z-score* indica la dirección de la desviación. #*P* valor<0,05; ##*P* valor<0,01 y ###*P* valor<0,001

### 5.1.2 Cambios en la cantidad y distribución de masa muscular

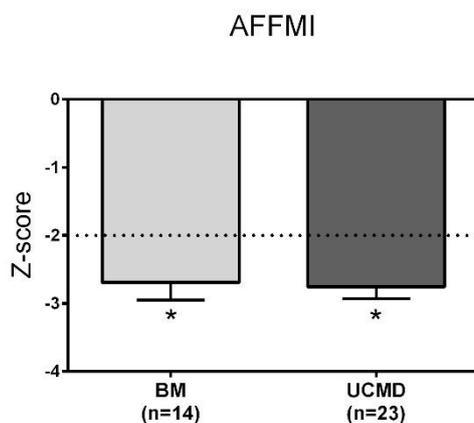
En relación a la cantidad de tejido muscular, expresada en LMI (*lean mass index* en inglés) se encontró una reducción en ambos grupos de pacientes. Esta reducción fue mayor en el grupo de pacientes UCMD (*Z-score*=-3,41), mientras que en el grupo BM no llegó a ser significativa (*Z-score*=-1,99).

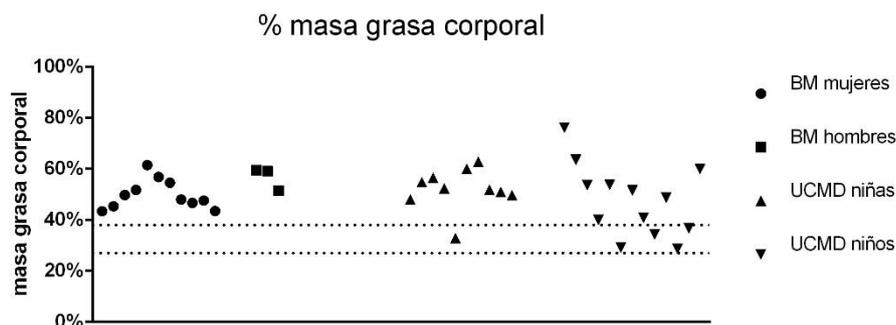
Se estudió la proporción de tejido muscular en extremidades superiores respecto extremidades inferiores, lo que puso de manifiesto una reducción selectiva de extremidades superiores en los pacientes BM rozando los niveles de significación (*Z-score*=1,99). Contrariamente, la pérdida de masa muscular en pacientes UCMD apareció prácticamente equivalente en ambos grupos de extremidades (*Z-score*=0,35).



**Figura 42: Cambios de cantidad y distribución de grasa magra en pacientes BM y UCMD: (A)** Masa magra normalizada a la altura al cuadrado (LMI) en relación a los valores de la población sana en pacientes BM y UCMD. **(B)** Relación entre la masa magra en las extremidades inferiores (piernas) y las extremidades superiores (brazos) respecto a la población sana en pacientes BM y UCMD. Los resultados se presentan comola media de la puntuación Z-score para cada grupo. La línea de puntos discontinuos indica el valor de significación estadística situado en  $\geq 2$  SD y se indica con el símbolo \* cuando se supera el umbral.

Otro indicador de la cantidad de masa magra es el Índice de masa muscular apendicular (AFFM) que se utiliza para definir un estado de sarcopenia cuando se encuentra por debajo de 2 desviaciones estándar del valor medio observado en la población de referencia para la misma edad y sexo. Cuando este AFFM se acompaña de aumento de la masa grasa por encima del 28 % en hombres y 40% en mujeres (Baumgartner et al; 2004) definimos esta alteración como "obesidad sarcopénica" (Stenholm et al; 2008) (Merlini et al; 2014). Nuestras poblaciones UCMD y BM mostraron un perfil de obesidad sarcopénica dado que la prevalencia de sarcopenia ( $AFFM \geq 2\sigma$ ) en el grupo UCMD fue del 82,6%y del 73,3% en el BM y el porcentaje de masa grasa era superior al 40% en el 78,3% de los pacientes UCMD y 100 % de los pacientes BM, tanto de sexo masculino como femenino.



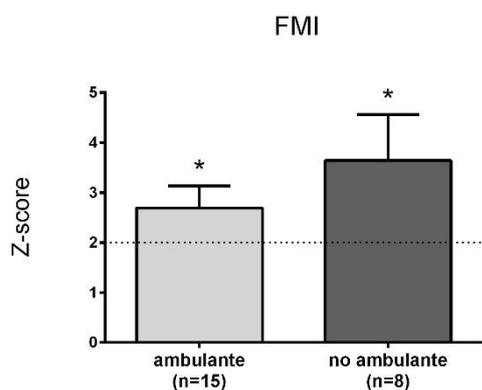


**Figura 43: Determinación de pacientes BM y UCMD afectados de sarcopenia y obesidad sarcopénica:** (A) Sarcopenia en pacientes BM y UCMD expresada por medio de AFFMI cuando este se encontró por debajo de 2SD (línea de puntos discontinua) en relación a la población control. Los resultados se presentan como la media de la puntuación *Z-score* y el símbolo \* indica las diferencias estadísticamente significativas. (B) Representación de la media del porcentaje masa grasa corporal en pacientes BM y UCMD divididos por sexo. El porcentaje de grasa corporal en cada paciente se calculó como el cociente entre el valor de la cantidad total de masa grasa corporal y el peso del individuo. El valor obtenido se multiplicó por 100. Las líneas de puntos discontinuos indican el umbral de obesidad basado en (Baumgartner, 2000) (>27% en hombres y >40% mujeres).

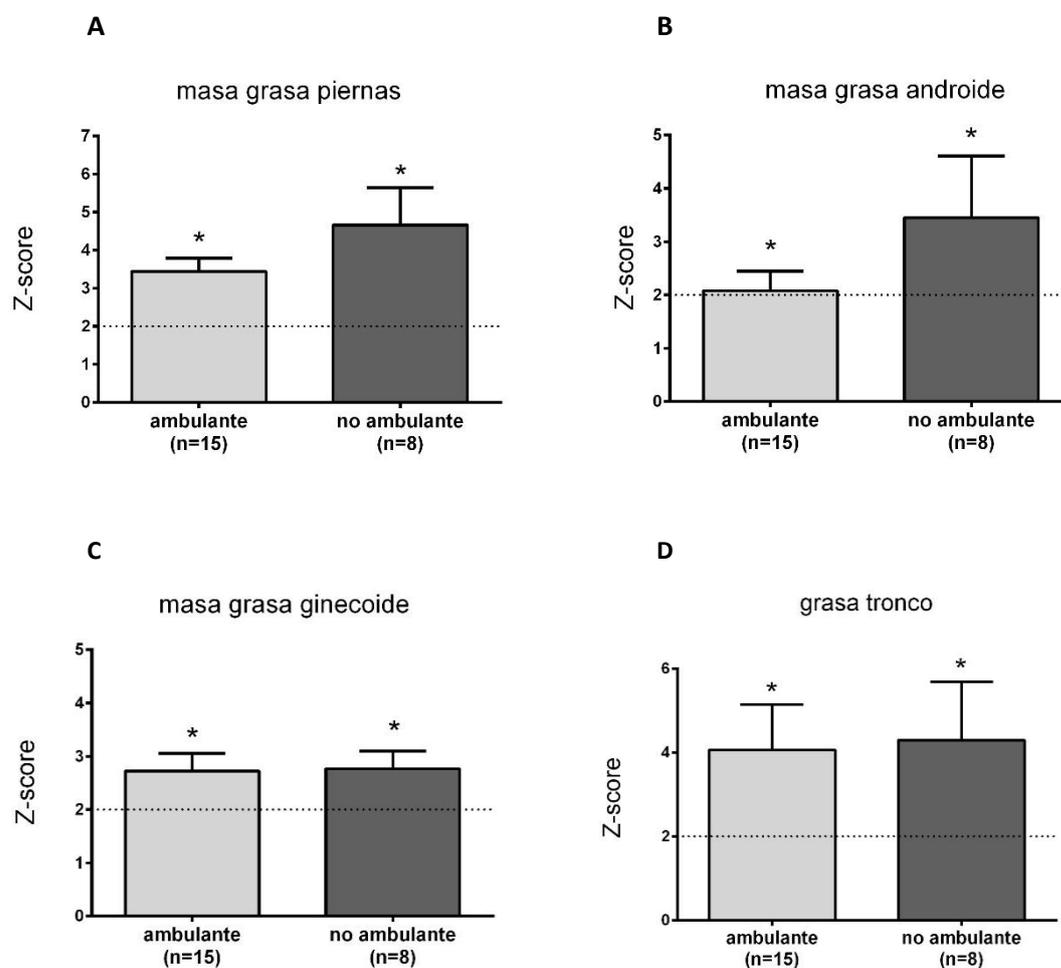
### 5.1.3 Efecto del estado de ambulación en la composición corporal en pacientes con déficit de colágeno VI

Dentro del grupo de pacientes en los que se estudió su composición corporal mediante DXA, se incluyeron tanto pacientes con ambulación conservada como aquellos que ya la habían perdido en el momento del análisis o nunca la habían alcanzado. Dado que se consideró un factor influyente en el análisis de composición y distribución corporal, se analizaron en detalle los cambios observados en los grupos de pacientes UCMD en función de si eran ambulantes o no y se compararon entre ellos. Todos los pacientes BM incluidos en este trabajo conservaban la deambulación por lo que el siguiente análisis no fue necesario.

Por lo que respecta al FMI, los pacientes no ambulantes presentaron una cantidad de masa grasa corporal 35,2% mayor que aquellos ambulantes, aunque esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa. De manera similar, la cantidad de masa grasa depositada en extremidades inferiores y región androide siguieron un patrón parecido, mostrándose aumentada un 35,3% y 65,8% respectivamente en el grupo de pacientes no ambulantes, si bien estos aumentos no fueron significativos. Por el contrario, las diferencias entre grupos en cuanto a la cantidad de masa grasa depositada en la región ginecoide y la región del troco fueron mínimas.

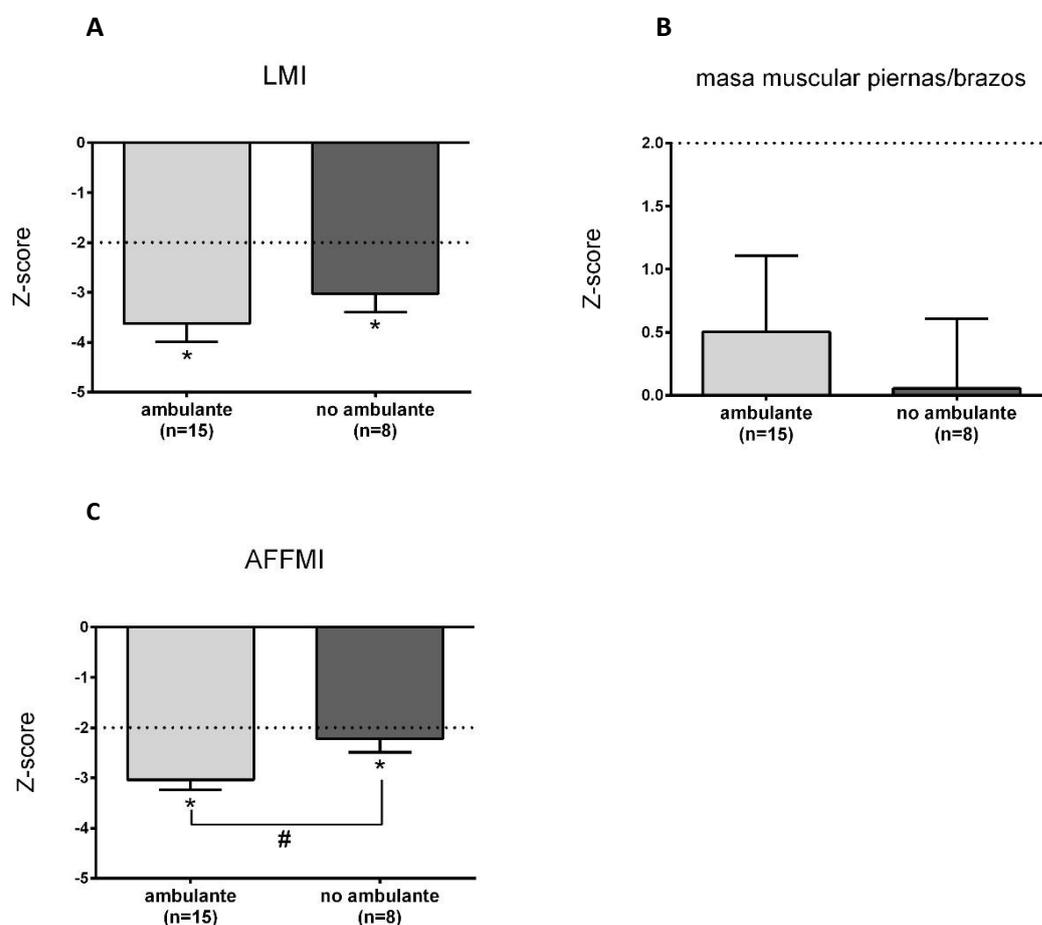


**Figura 44: Influencia del estado de deambulaci3n en la cantidad de grasa corporal en pacientes UCMD:** Masa grasa normalizada por la altura al cuadrado (FMI) en relaci3n a los valores de poblaci3n sana de referencia en pacientes UCMD. Los resultados se presentan como la media de la puntuaci3n Z-score para cada grupo y el umbral para la significaci3n estadística se representa en las gráficas con la lınea discontinua en  $\geq 2$  SD, cuando se supera el umbral se indica con el sımboło \*.



**Figura 45: Influencia del estado de deambulaci3n en los cambios de cantidad y distribuci3n de grasa corporal en pacientes UCMD:** (A) Porcentaje de masa grasa localizada en las piernas respecto a la poblaci3n sana en pacientes UCMD. Representaci3n del porcentaje de masa grasa localizada en la regi3n androide (B) y ginecoide (C) en pacientes UCMD en relaci3n a la poblaci3n de referencia. Porcentaje de masa grasa ginecoide y de masa localizada en el tronco (D) en relaci3n a controles sanos, en pacientes UCMD. Debido a la limitada cantidad de muestra, se estudi3 el conjunto de pacientes en funci3n del estado de deambulaci3n sin tener en cuenta el sexo en ninguno de los dos grupos. Los resultados se presentan como la media de la puntuaci3n Z-score para cada grupo y el umbral para la significaci3n estadística se representa en las gráficas con la lınea discontinua en  $\geq 2$  SD, cuando se supera el umbral se indica con el sımboło \*.

En cuanto a los cambios en la cantidad de masa muscular, la reducción en el LMI observada en el grupo de pacientes UCMD fue mayor para los ambulantes en relación a los no ambulantes con una diferencia del 16,6%, sin alcanzar un *P* valor significativo. No obstante, aunque la proporción de tejido muscular entre extremidades inferiores y superiores no fue significativa para el grupo UCMD, podemos ver que existieron grandes diferencias entre aquellos que conservaban la deambulación y los que no. Estos últimos presentaron un *Z-score* de tan solo el 0,056, conservando por lo tanto una distribución muy parecida a la población control de referencia, sin embargo, los pacientes ambulantes (*Z-score* =0,50) mostraron un *Z-score* un 8,96 veces mayor que los no ambulantes. Finalmente, el AFFMI resultó significativamente (*P*=0,025) reducido en un 36,8% en los pacientes ambulantes en relación a los no ambulantes.

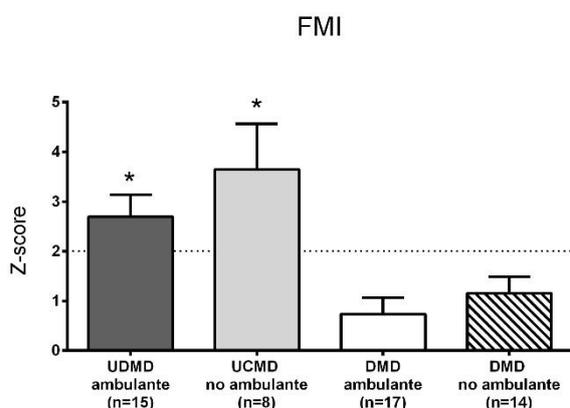


**Figura 46: Influencia del estado de deambulación en los cambios de cantidad y distribución de masa magra en pacientes UCMD:**(A) Masa magra normalizada por la altura al cuadrado (LMI) en relación a los valores de la población sana. (B) Relación entre la masa magra en las extremidades inferiores (piernas) y las extremidades superiores (brazos) respecto a la población sana. (C) Cantidad de masa magra localizada en extremidades representada como AFFMI. Los resultados se presentan como la media de la puntuación *Z-score* para cada grupo. La línea de puntos indica el valor de significación estadística situado en  $\geq 2$  SD y se indica con el símbolo \* cuando se supera el umbral. Las diferencias entre grupos de pacientes se indican con #*P*<0,05.

### 5.1.4 Comparación de la composición corporal de pacientes con distintas distrofias musculares

La pérdida de masa muscular es una característica común de las distrofias musculares, aunque en función del tipo de distrofia muscular, los pacientes tendrán un patrón selectivo de afectación de los grupos distintos grupos musculares (Díaz-Manera et al., 2015). Asimismo, en las distrofias musculares existe un reemplazamiento con tejido adiposo y conectivo ante la pérdida de masa muscular. Para evaluar si los cambios observados tanto en el patrón de aumento de masa grasa como en la pérdida de masa magra en los pacientes era una característica propia causada por el déficit parcial de colágeno VI o común a otras distrofias, se compararon los resultados obtenidos con la técnica DXA entre el grupo UCMD y un grupo de pacientes con DMD.

Como podemos observar en la **Figura 47**, la cantidad total de masa grasa (FMI) no se encontró significativamente aumentada en el grupo DMD, no obstante, del mismo modo que los pacientes UCMD, los pacientes DMD no ambulantes presentaron una mayor cantidad de masa grasa que los pacientes ambulantes con la misma patología. Este incremento fue del 57,3%.

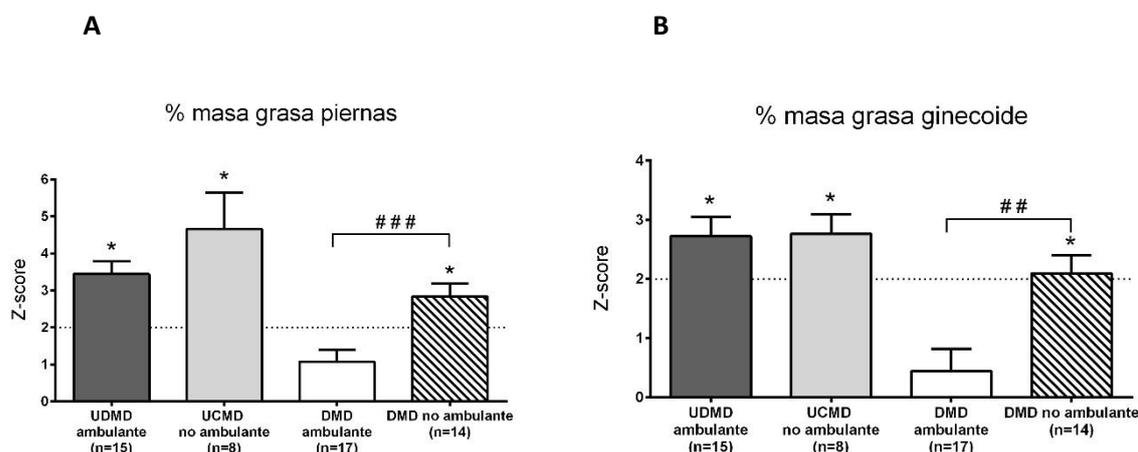


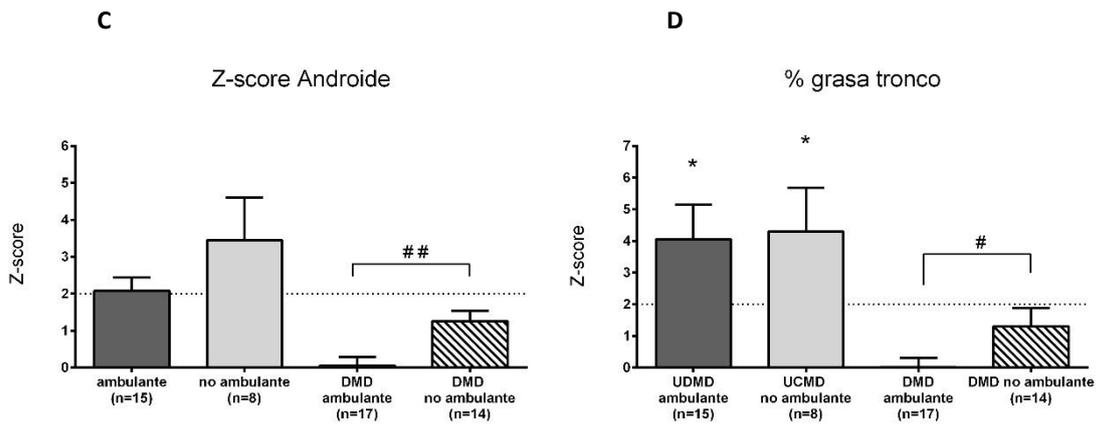
**Figura 47: Cantidad de grasa corporal en pacientes UCMD y DMD:** Masa grasa normalizada por la altura al cuadrado (FMI) en relación a los valores de población sana de referencia en pacientes UCMD y DMD. Los resultados se presentan como la media de la puntuación *Z-score* para cada grupo y el umbral para la significación estadística se representa en las gráficas con la línea discontinua en  $\geq 2$  SD, cuando se supera el umbral se indica con el símbolo \*.

El patrón de distribución de la masa grasa en pacientes ambulantes y no ambulantes mostró una tendencia parecida para ambos grupos, existiendo mayor cantidad de masa grasa en las extremidades inferiores de los pacientes no ambulantes, especialmente en el grupo de los pacientes UCMD. Aunque la cantidad de masa grasa en extremidades inferiores presente en el grupo DMD fue menor a la de los UCMD, se observó una diferencia significativa ( $P < 0,001$ ) con un incremento del *Z-score* de 1,67 veces en los pacientes del grupo DMD que habían perdido la deambulacion en relación a aquellos que aun la conservaban.

La cantidad de masa grasa depositada en la región ginecoide y androide fue mayor en los pacientes UCMD que en los DMD. A diferencia del grupo UCMD, que no presentó diferencias en en relación al estado de deambulacion de sus pacientes, en el grupo DMD existió un aumento de 3,7 ( $P = 0,021$ ). veces en la cantidad de grasa ginecoide y 20,2 ( $P = 0,0028$ ) veces en la cantidad de grasa androide en los pacientes no ambulantes respecto los ambulantes

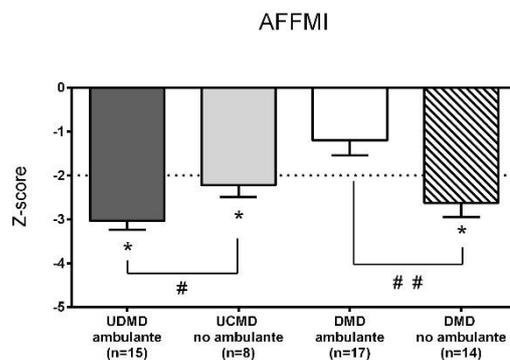
Del mismo modo, una vez más, la cantidad de grasa presente en la región del tronco fue mayor en los pacientes UCMD que en los DMD tal y como se puede observar en la **Figura 48**. Sin embargo, la diferencias entre pacientes con deambulacion conservada y aquellos que la había perdido, fue mayor en el grupo DMD con un incremento significativo ( $P = 0,043$ ) en el valor de *Z-score* de 1,7 veces.

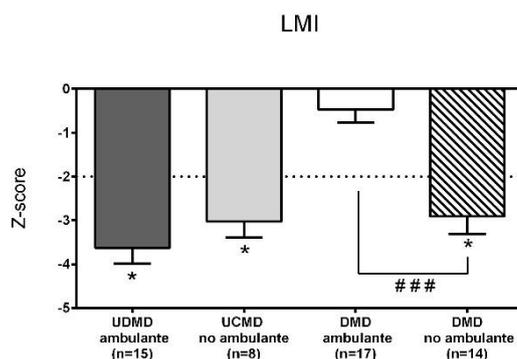




**Figura 48: Cambios de cantidad y distribución de grasa corporal en pacientes UCMD y DMD: (A)** Porcentaje de masa grasa localizada en las piernas respecto a la población sana en pacientes UCMD y DMD, representados según el estado de deambulación. **(B)** Cantidad de masa grasa depositada en región androide, ginecoide **(C)** y tronco **(D)** en pacientes UCMD y DMD. Los resultados se presentan como la media de la puntuación Z-score para cada grupo y el umbral para la significación estadística se representa en las gráficas con la línea discontinua en  $\geq 2$  SD, cuando se supera el umbral se indica con el símbolo \*. El signo positivo o negativo del Z-score indica la dirección de la desviación. Las diferencias entre grupos de pacientes ambulantes y no ambulantes se indican con # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,01$  y ### $P < 0,001$ .

Quando se analizó el LMI, los valores de Z score obtenidos en los pacientes no ambulantes de ambos grupos resultaron parecidos (Z score UCMD=-3,02 y Z score DMD=-2,90). Resultados muy parecidos se obtuvieron para el AFFMI para los pacientes no ambulantes (Z score UCMD=-2,22  $P=0,026$  y Z score DMD=-2,62). Pese a esta similitud, los pacientes que sí conservaban la deambulación de ambos grupos se comportaron de manera distinta en las dos patologías. Mientras que la reducción del LMI y AFFMI en el grupo UCMD fue mayor para el grupo de ambulantes que el de no ambulantes, los pacientes DMD ambulantes apenas mostraron diferencias respecto la población control (Z score LMI=-0,48 y Z score AFFMI=-1,20) y aquellos que habían perdido la deambulación mostraron una reducción del muy significativa respecto a los pacientes DMD que aun la conservaban para ambas mediciones (LMI  $P < 0,001$  y AFFMI  $P=0,006$ ).





**Figura 49: Cambios de cantidad y distribución de grasa magra en pacientes BM y UCMD: (A)** Masa magra normalizada a la altura al cuadrado (LMI) en relación a los valores de la población sana en pacientes BM y UCMD. **(B)** Relación entre la masa magra en las extremidades inferiores (piernas) y las extremidades superiores (brazos) respecto a la población sana en pacientes BM y UCMD. Los resultados se presentan comola media de la puntuación *Z-score* para cada grupo. La línea de puntos discontinuos indica el valor de significación estadística situado en  $\geq 2$  SD y se indica con el símbolo \* cuando se supera el umbral. Las diferencias entre grupos de pacientes ambulantes y no ambulantes se indican con # $P < 0,05$ ; ## $P < 0,01$  y ### $P < 0,001$ .

## 5.2 Determinación de adipocinas circulantes en pacientes con miopatías relacionadas con déficits en colágeno VI

Los resultados obtenidos hasta el momento pusieron de manifiesto que los pacientes con mutaciones en uno de los tres genes que codifican para colágeno VI sufrían cambios en la cantidad y distribución de tejido adiposo, incluida aquella localizada en la zona androide estrechamente relacionada con un aumento del riesgo cardiovascular.

Factores liberados por el tejido adiposo, llamados adipoquinas, capaces de actuar a nivel local y en tejidos periféricos, tienen importantes roles en la homeostasis energética y procesos inflamatorios entre otros. Son estos factores u hormonas los que asumen el control de la función endocrina del tejido adiposo y cuya desregulación, por ende, forma parte de la fisiopatología de la obesidad y la sensibilidad a la insulina.

Estudios de expresión génica realizados recientemente en nuestro laboratorio (Paco et al., 2013) demostraron la sobreexpresión en biopsias musculares de pacientes UCMD varias adipoquinas en relación a músculos sanos.

Para evaluar la posibilidad que el déficit de colágeno VI fuera capaz de promover cambios en los niveles circulantes de adipoquinas se estudiaron los niveles de tres de ellas en suero de

## RESULTADOS CAPÍTULO 2

pacientes BM y UCMD y se compararon con los niveles en suero de controles adultos e infantiles así como de pacientes DMD como grupo de control patológico.

La primera hormona propuesta para este estudio fue la leptina. La leptina es una hormona secretada por el tejido adiposo implicada en la homeostasis energética, definida por el correcto balance entre ingesta y gasto de energía, así como en la fisiopatología de la resistencia a insulina y el síndrome metabólico (Yadav et al., 2013). Recientemente se ha descrito que esta adipoquina regula directamente la expresión de la cadena alfa 3 del colágeno VI (COL6A3) (McCulloch et al., 2014). Este hecho, conjuntamente con el aumento de tejido adiposo observado en los pacientes BM y UCMD y los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Paco et al., 2013), donde describimos un aumento de la expresión del gen de leptina (*Fold Change*= 5,1) en biopsias musculares de pacientes no llevó a investigar sus niveles en suero.

La adiponectina es una hormona específicamente secretada por el tejido adiposo. Su acción en la sensibilización a la insulina a través de la oxidación de lípidos y la mejora de la señalización de insulina, entre otras, la convierte en un importante elemento en el estudio de la obesidad y síndrome metabólico (Shehzad et al., 2012) (Caselli, 2014). Del mismo modo que la leptina, sus niveles aparecieron elevados en el músculo de pacientes UCMD (*Fold change*= 9,6) (Paco et al., 2013). Por este motivo, se decidió cuantificar los niveles en suero de la adiponectina, concretamente la forma de alto peso molecular (HMW, *high molecular weigh* en inglés), considerado mayor indicador de resistencia a insulina que los niveles totales de adiponectina.

En base a los resultados obtenidos en trabajos anteriores, la última hormona estudiada en el grupo de pacientes UCMD fue el RBP4 (*retinol binding protein*), cuya expresión génica fue la más diferencialmente aumentada en el músculo de pacientes UCMD (*Fold Change*=19,6). A la hormona RBP4 se le ha otorgado en numerosos trabajos un papel en la resistencia a insulina y la obesidad.

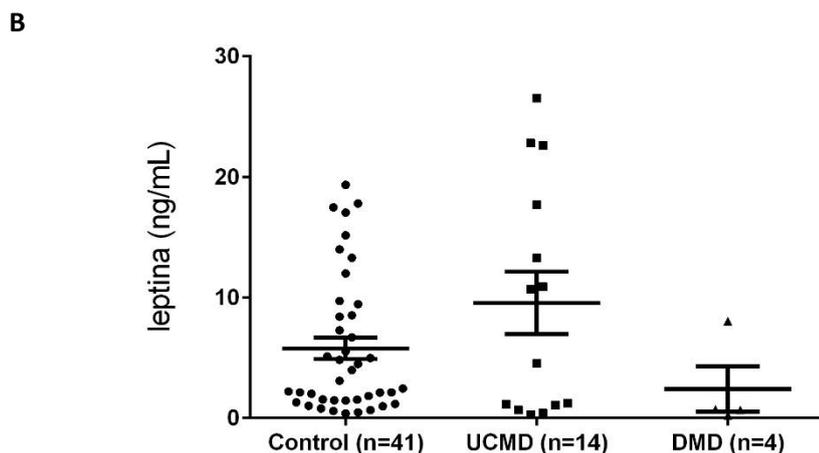
### 5.2.1 Determinación de los niveles circulantes de adipocinas en pacientes UCMD.

Dado que la leptina y adiponectina muestra dimorfismo sexual, con valores más altos en las mujeres desde el momento del nacimiento (Luque-Ramírez et al., 2013), se realizó una comparación de los sujetos subdivididos por sexo para cada grupo principal de pacientes y controles. Las determinaciones de leptina no mostraron diferencias significativas en función del sexo en los pacientes UCMD ( $P=0,499$ ) ni en los controles de edad similar ( $P=0,245$ ). Tampoco hubo cambios significativos en los niveles de adiponectina HMW entre niños y niñas UCMD ( $P=0,899$ ) o controles ( $P=0,225$ ), por lo que el análisis de ambas hormonas se hizo en el conjunto de pacientes sin tener en cuenta el sexo.

Como podemos observar en la siguiente figura, cuando se compararon los niveles de leptina en pacientes UCMD con un grupo de controles de edad similar, se halló un ligero aumento en el suero de los pacientes UCMD, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P=0,081$ ). En el caso de los pacientes DMD, los niveles de leptina fueron inferiores a los de la media de los controles y también a los de los UCMD, no obstante, en ningún caso esta reducción resultó significativa al compararla con los respectivos grupos.

A

	Control	UCMD	DMD
<b>Número de participantes</b>			
total	41	14	4
niños	18	8	4
niñas	23	6	-
<b>Edad (años)</b>			
total	9,93±1,09	11,28±1,86	7 ±1,62
niños	9,11±1,21	12,87±3,14	7 ±1,62
niñas	10,56±1,75	9,17±3,74	-
<b>Leptina (ng/ml)</b>			
total	5,77±0,89	9,55±2,48	2,41±1,88
niños	4,59±1,25	7,97±3,29	2,41±1,88
niñas	6,69±1,23	11,66±4,76	-



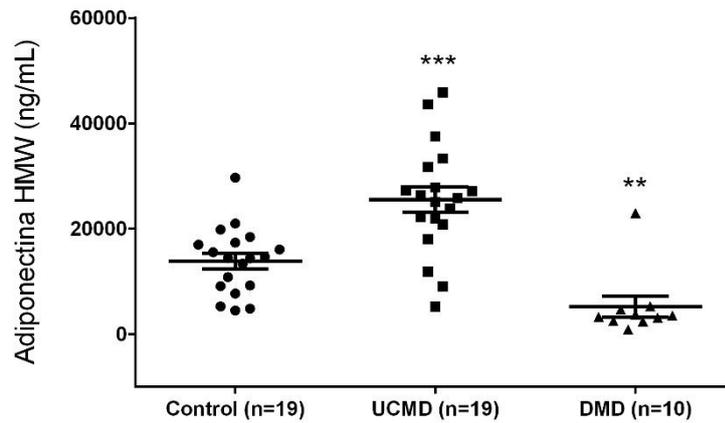
**Figura 50: Niveles de leptina en suero de pacientes UCMD.** Las muestras de suero de pacientes UCMD, DMD y controles fueron analizadas mediante la técnica de ELISA para detectar los niveles de leptina presentes. En la tabla (A) se muestra la información sobre el número de pacientes incluidos en cada grupo así como el sexo y la edad. Los valores de leptina para cada subgrupo están expresados como la media  $\pm$  SEM y representados en la gráfica (B).

Con respecto a los niveles de adiponectina HMW en suero, los pacientes UCMD mostraron un aumento muy significativo ( $p < 0,001$ ) en relación con los controles (**Figura 51**). Por el contrario, los pacientes con DMD mostraron una reducción significativa de los niveles de adiponectina HMW tanto respecto el grupo control ( $P=0,0017$ ) como en relación a los pacientes UCMD ( $P < 0,001$ ).

**A**

	Control	UCMD	DMD
<b>Número de participantes</b>			
total	19	19	10
niños	10	10	10
niñas	9	9	-
<b>Edad (años)</b>			
total	8,95 $\pm$ 1,15	11,71 $\pm$ 1,45	10 $\pm$ 0,92
niños	8,6 $\pm$ 1,78	12,9 $\pm$ 2,63	10 $\pm$ 0,92
niñas	9,33 $\pm$ 1,52	10,4 $\pm$ 1,26	-
<b>Adiponectina (ng/ml)</b>			
total	13881,22 $\pm$ 1454,10	25542,8 $\pm$ 2401,43	5253,01 $\pm$ 2007,93
niños	12170,94 $\pm$ 1925,60	25842,99 $\pm$ 3148,28	5253,01 $\pm$ 2007,93
niñas	15781,53 $\pm$ 2133,24	25209,24 $\pm$ 3869,95	-

B



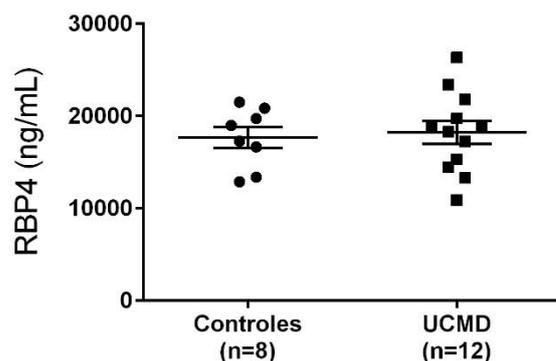
**Figura 51: Niveles de adionectina HMW en suero de pacientes UCMD.** Las muestras de suero de pacientes UCMD, DMD y controles fueron analizadas mediante la técnica de ELISA para detectar los niveles de adiponectina HMW presentes. En la tabla (A) se muestra la información sobre el número de pacientes incluidos en cada grupo así como el sexo y la edad. Los valores de adiponectina HMW para cada subgrupo están expresados como la media  $\pm$  SEM y representados en la gráfica (B). \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  respecto la media de los controles.

Finalmente, los resultados obtenidos de la determinación del RBP4 mediante ELISA en los pacientes UCMD y controles nos mostraron valores muy similares entre ambos grupos con un ligero aumento en el grupo UCMD tal y como se puede apreciar en la siguiente figura.

A

	Control	UCMD
<b>Número de participantes</b>		
total	8	12
niños	3	7
niñas	5	5
<b>Edad (años)</b>		
total	9,05 $\pm$ 0,38	8,25 $\pm$ 1,16
niños	8,44 $\pm$ 0,47	7,17 $\pm$ 2,21
niñas	9,42 $\pm$ 0,50	9,6 $\pm$ 0,87
<b>Adiponectina (ng/ml)</b>		
total	17664,85 $\pm$ 1145,40	18215,36 $\pm$ 1260,39
niños	17392,66 $\pm$ 2345,37	18945,78 $\pm$ 1957,30
niñas	17828,17 $\pm$ 1416,12	18798,14 $\pm$ 1353,22

B



**Figura 52: Niveles de RBP4 en suero de pacientes UCMD.** Las muestras de suero de pacientes UCMD, DMD y controles fueron analizadas mediante la técnica de ELISA para detectar los niveles de RBP4. En la tabla (A) se muestra la información sobre el número de pacientes incluidos en cada grupo así como el sexo y la edad. Los valores de adiponectina HMW para cada subgrupo están expresados como la media  $\pm$  SEM y representados en la gráfica (B).

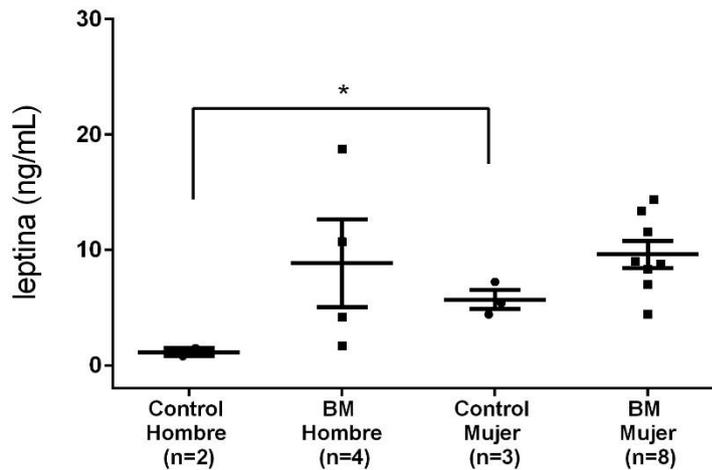
### 5.2.2 Determinación de los niveles circulantes de adipocinas en pacientes BM.

Como se ha comentado anteriormente, el rango de los valores de leptina en la población sana varían en función del sexo. Por este motivo, se realizó una primera comparación de los niveles hallados en suero de pacientes BM así como de los controles teniendo en cuenta el sexo de cada individuo. No encontraron diferencias significativas entre los hombres y mujeres con BM ( $P=0,81$ ), sin embargo, en el grupo control las mujeres exhibieron valores superiores a los de los hombres ( $P=0,026$ ). Por este motivo los pacientes y controles fueron divididos por sexo para el correcto análisis.

A

	Control	BM
<b>Número de participantes</b>		
total	5	12
hombres	2	4
mujeres	3	8
<b>Edad (años)</b>		
total	31 $\pm$ 4,01	38,27 $\pm$ 3,37
hombres	34,5 $\pm$ 10,50	41,1 $\pm$ 1,94
mujeres	28,67 $\pm$ 3,18	37,2 $\pm$ 4,61
<b>Leptina (ng/ml)</b>		
total	3,87 $\pm$ 1,21	9,35 $\pm$ 1,38
hombres	1,14 $\pm$ 0,34	8,84 $\pm$ 3,81
mujeres	5,69 $\pm$ 2,32	9,60 $\pm$ 1,17

B

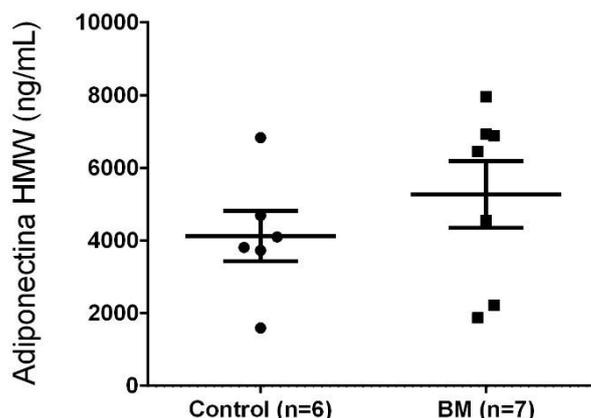


**Figura 53: Niveles de leptina en suero de pacientes BM.** Las muestras de suero de pacientes BM y controles fueron analizadas mediante la técnica de ELISA para detectar los niveles de leptina presentes. En la tabla (A) se muestra la información sobre el número de pacientes incluidos en cada grupo así como el sexo y la edad. Los valores de leptina para cada subgrupo están expresados como la media  $\pm$  SEM y representados en la gráfica (B). \* $P < 0,05$ .

La determinación de adiponectina HMW no mostró diferencias significativas en relación al sexo en ninguno de los dos grupos por lo que se realizó de manera conjunta para la totalidad del grupo BM y controles. Se observó una tendencia con valores aumentados en el grupo BM, pese a que las diferencias grupo control no fueron estadísticamente significativas.

A

	Control	BM
<b>Número de participantes</b>		
total	6	7
hombres	3	4
mujeres	3	3
<b>Edad (años)</b>		
total	31,5 $\pm$ 2,65	36 $\pm$ 2,76
hombres	33,33 $\pm$ 4,81	41,07 $\pm$ 1,68
mujeres	29,67 $\pm$ 3,88	30,93 $\pm$ 4,20
<b>Adiponectina (ng/ml)</b>		
total	4124,69 $\pm$ 690 $\pm$ 83	5263,26 $\pm$ 701,22
hombres	3044,32 $\pm$ 726,12	3044,32 $\pm$ 726,12
mujeres	5205,05 $\pm$ 831,71	7097,73 $\pm$ 274,40



**Figura 54: Niveles de adiponectina HMW en suero de pacientes BM.** Las muestras de suero de pacientes BM y controles fueron analizadas mediante la técnica de ELISA para detectar los niveles de adiponectina HMW. En la tabla (A) se muestra la información sobre el número de pacientes incluidos en cada grupo así como el sexo y la edad. Los valores de adiponectina HMW para cada subgrupo están expresados como la media  $\pm$  SEM y representados en la gráfica (B).

### 5.3 Relación entre los cambios de composición corporal, niveles circulantes de adipoquinas y función física en pacientes con déficit de colágeno VI

Los resultados obtenidos hasta el momento, demostraron cambios en la composición corporal así como en la cantidad, tanto de tejido adiposo como muscular. Del mismo modo, varias de las adipoquinas estudiadas mostraban una tendencia a estar aumentadas en el suero de pacientes UCMD y BM.

Por tal de estudiar la contribución de los cambios observados de composición corporal a los niveles de adipoquinas y a la función física de los pacientes BM y UCMD se realizó un estudio de correlación.

La función física de los pacientes pediátricos fue examinada en colaboración con la Unidad de Rehabilitación y Medicina Física del Hospital Sant Joan de Déu mediante la realización de una serie de escalas estandarizadas tal y como se detalla en el apartado 3.9 de materiales y métodos. En el caso de los pacientes adultos, todos ellos provenientes de otros hospitales, no se pudo disponer de información sobre el estado funcional.

En el grupo UCMD se dividió la muestra en pacientes ambulantes y no ambulantes debido a las particularidades que requirieron de las pruebas de evaluación física para cada condición de deambulación así como las diferencias observadas en los resultados anteriores del análisis de composición corporal. A causa del reducido tamaño de la muestra, los individuos de sexo

femenino y masculino se analizaron conjuntamente, si bien se distinguieron gráficamente para su identificación.

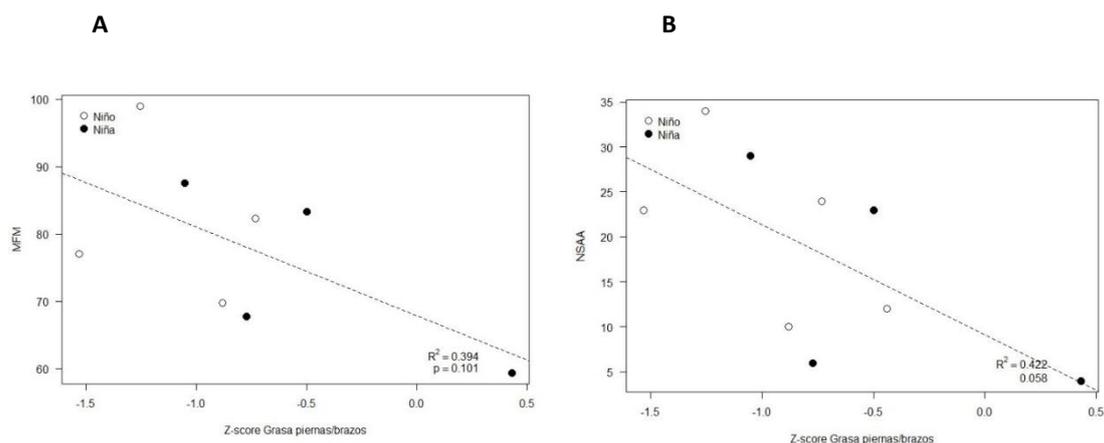
### 5.3.1 Correlación entre la composición corporal y la función motora

#### Pacientes UCMD ambulantes

En los pacientes UCMD que conservaban la deambulaci3n, el indicador general de la cantidad de tejido adiposo, FMI mostr3 una buena correlaci3n con el tiempo que empleaban los pacientes en realizar las pruebas f3sicas basadas en subir y bajar 4 escalones y recorrer 10 metros. De manera similar, estas pruebas f3sicas guardaron una estrecha correlaci3n con la masa grasa depositada en extremidades inferiores y la ratio de la masa grasa entre piernas y brazos as3 como aquella perteneciente a las regiones ginecoide y androide. La mayor3a de estas correlaciones fueron estad3sticamente significativas como se indica en la **Tabla 10**.

Contrariamente, la cantidad de masa grasa situada en las piernas tubo una correlaci3n negativa con los metros recorridos en 6 minutos, aunque esta correlaci3n no result3 significativa.

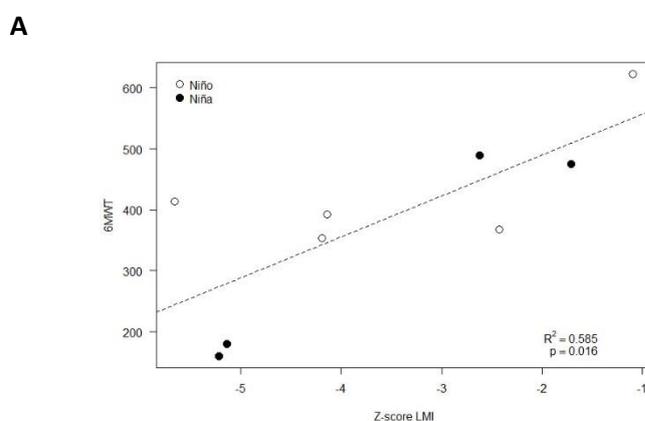
Siguiendo la misma tendencia, se observ3 una correlaci3n negativa entre la ratio de la grasa situada en piernas respecto brazos y aquella correspondiente a la regi3n ginecoide con la puntuaci3n obtenida en la escala funcional NSAA. Asimismo la ratio de la cantidad de masa grasa presente en piernas respecto brazos se correlacion3 negativamente con la puntuaci3n MFM. La escala funcional PUL no pareci3 verse afectada con los dep3sitos de grasa comentados hasta ahora, pero s3 mostr3 una correlaci3n negativa con el BMI y la grasa localizada en la regi3n del tronco. Las escalas funcionales mencionadas, NSAA, MFM y PUL, a mayores puntuaciones ponen de manifiesto la incapacidad del paciente de realizar las actividades demandadas durante la prueba. El conjunto de estos datos nos indica un efecto negativo del exceso de masa grasa en la correcta realizaci3n de las pruebas funcionales tanto cronometradas como basadas en un conjunto de ítems.

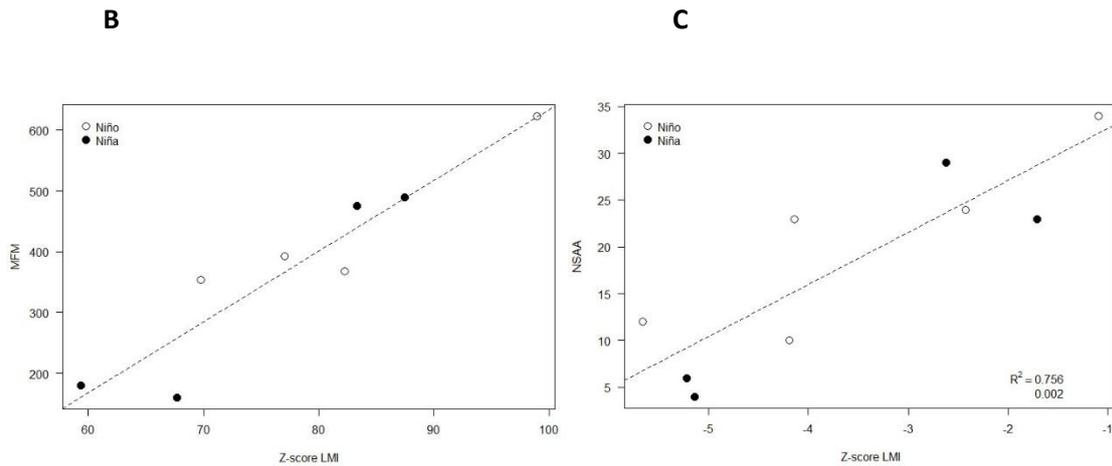


**Figura 55: Correlación entre la cantidad de masa grasa y función motora.** Las gráficas muestran la correlación lineal entre la proporción de masa grasa depositada en piernas respecto brazos y la puntuación de los test funcionales MFM (A) y NSAA (B). Se indican los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el valor P.

Del mismo modo que la masa grasa, la masa magra relevó su estrecha correlación con varios indicadores de la función muscular.

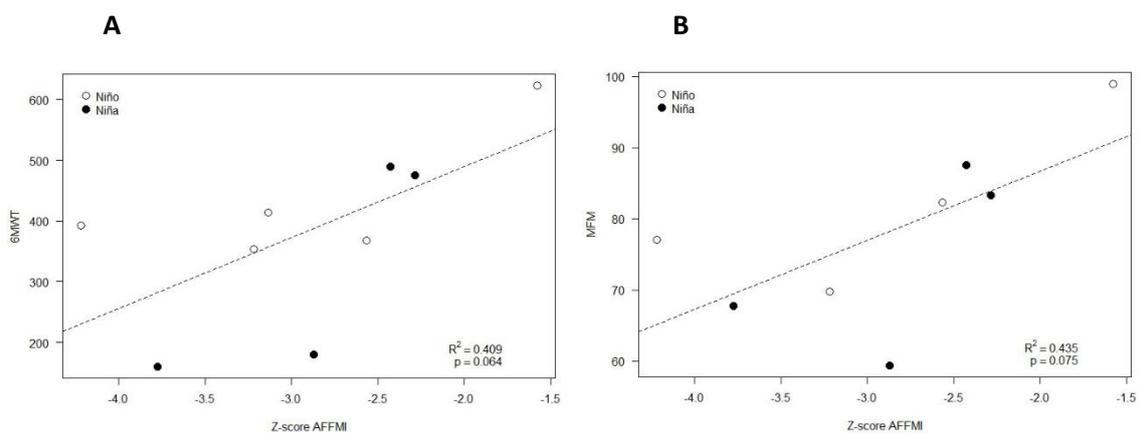
En primer lugar, la cantidad total de masa magra, indicada como LMI, exhibió una correlación positiva y estadísticamente significativa con los metros recorridos en 6 minutos y con la puntuación que obtuvieron los pacientes en las escalas funcionales MFM y NSAA, indicando que a mayor cantidad de tejido muscular, mayor fue la distancia recorrida en 6 minutos y mayor la facilidad que tuvieron en realizar las actividades requeridas en las pruebas funcionales MFM y NSAA.





**Figura 56: Correlación entre la cantidad de masa magra y función motora.** La gráfica (A) muestra la correlación lineal entre el número de metros recorridos en 6 minutos (6MWT) y el Z-score LMI y las gráficas (B) y (C), la correlación lineal entre el Z-score LMI y las puntuaciones de los test funcionales MFM y el NSAA respectivamente. Se indican los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el valor  $P$ .

Al analizar la cantidad de masa muscular conforme a su disposición en distintas regiones del cuerpo se observó que la ratio de los depósitos situados en las extremidades inferiores respecto las superiores guardaban una estrecha correlación positiva con el tiempo en subir y bajar 4 escalones, siendo estadísticamente significativa en el caso de la primera actividad. El índice AFFMI cuyos valores se encontraron significativamente reducidos en los pacientes UCMD ambulantes, se correlacionó positivamente con los metros que recorrieron en 6 minutos así como con la puntuación MFM, aunque estas correlaciones no alcanzaron la significación estadística.



**Figura 57: Correlación entre el AFFMI y función motora.** La gráfica de la izquierda (A) muestra la correlación lineal entre el número de metros recorridos en 6 minutos (6MWT) y el Z-score AFFMI y la gráfica de la derecha (B) muestra la correlación lineal entre la puntuación del test funcional MFM y el Z-score AFFMI. Se indican los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el valor  $P$ .

## RESULTADOS CAPÍTULO 2

Finalmente, el indicador de calidad de vida en el paciente, PedsQL, se correlacionó positivamente con múltiples indicadores de la cantidad y distribución de la masa grasa, especialmente con aquella localizada en la región del tronco. Esta última correlación resultó estadísticamente significativa indicando que a mayor cantidad de grasa presente en el tronco, mayor puntuación se obtenía en el cuestionario PedsQL indicando peor percepción por parte del paciente de su calidad de vida.

	6MWT	Levantarse del suelo	Subir 4 escalones	Bajar 4 escalones	Deambular 10 m	MFM	NSAA	PUL	PedsQL	PedsQL Padres
Z-score BMI	-0,123	0,440	0,269	0,235	0,531	-0,151	-0,311	-0,687	0,661	0,427
Z-score Grasa Tronco	-0,243	0,554	0,208	0,189	0,321	-0,434	-0,441	-0,639	0,842**	0,492
Z-score Grasa piernas/brazos	-0,548	0,535	0,771*	0,746*	0,749*	-0,620	-0,650	0,066	0,583	0,525
Z-score Magro piernas/brazos	-0,214	0,103	0,714*	0,662	0,507	-0,377	-0,381	-0,448	0,435	0,101
Z-score FMI	-0,458	0,042	0,694*	0,656	0,700*	-0,426	-0,383	-0,557	0,688	0,380
Z-score LMI	0,765*	-0,194	-0,545	-0,546	-0,590	0,925**	0,870**	0,313	-0,535	-0,095
Z-score AFFMI	0,639	-0,100	-0,186	-0,224	-0,175	0,660	0,572	-0,118	-0,239	-0,013
Z-score Androide	-0,385	0,510	0,629	0,591	0,728*	-0,429	-0,511	-0,458	0,673	0,583
Z-score Ginecoide	-0,579	0,550	0,737*	0,711*	0,815**	-0,599	-0,645	-0,479	0,696	0,544
Z-score A/G	-0,033	0,453	0,367	0,330	0,417	-0,147	-0,273	-0,268	0,369	0,424
Z-score Grasa piernas	-0,622	0,182	0,696*	0,673*	0,806**	-0,544	-0,541	-0,352	0,695	0,487

**Tabla 10: Correlación entre la composición corporal y la función motora en pacientes UCMD ambulantes.** En esta tabla se muestran los valores del coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables que expresan los cambios de composición y distribución corporal y aquellas que nos informan sobre la función motora y de calidad de vida de los pacientes. Los valores de  $r$  que superaron el número 0,600 se marcaron en rojo claro. Se calculó la significación estadística de cada correlación mediante el test  $t$  de Student de manera bilateral, \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$ .

**Pacientes UCMD no ambulantes**

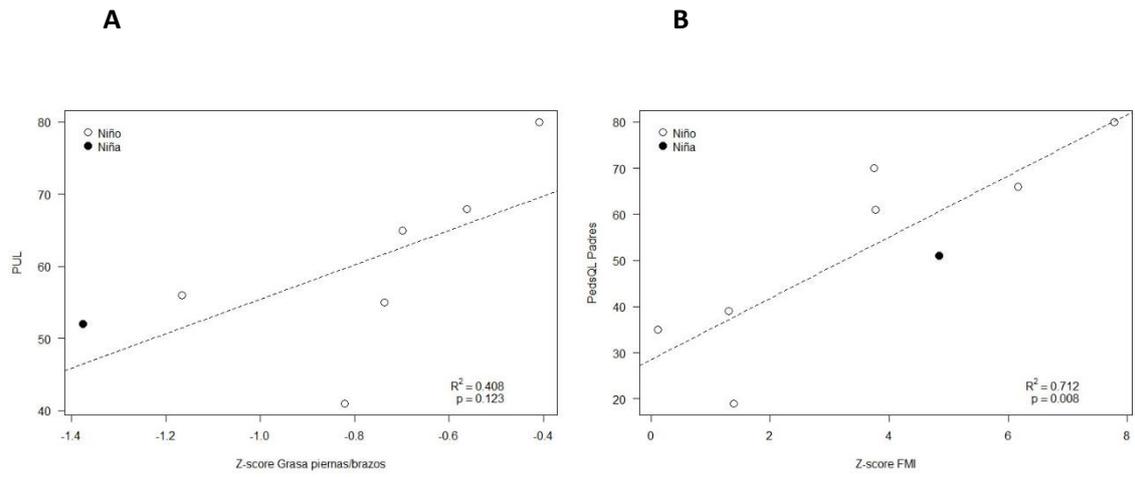
Como se comentó anteriormente y se detalla en el apartado 3.9 de Materiales y métodos la función física de los pacientes que habían perdido la deambulaci3n en el momento del estudio se evalu3 con escalas funcionales espec3ficas para su condici3n. En la siguiente tabla se muestran los valores de los coeficientes de Pearson calculados para cada correlaci3n.

	EK2	PUL	PedsQL	PedsQL Padres
Z-score BMI	-0,023	-0,121	0,432	0,432
Z-score Grasa Tronco	-0,417	0,180	0,275	0,724*
Z-score Grasa piernas/brazos	-0,080	0,639	-0,308	-0,222
Z-score Magro piernas/brazos	-0,227	0,529	0,185	-0,515
Z-score FMI	-0,435	0,201	0,255	0,848**
Z-score LMI	0,378	0,598	0,327	-0,153
Z-score AFFMI	0,391	-0,083	0,623	0,309
Z-score Androide	-0,342	0,236	0,247	0,670
Z-score Ginecoide	-0,341	-0,484	-0,005	0,516
Z-score A/G	-0,191	0,307	0,292	0,576
Z-score Grasa piernas	-0,287	-0,282	0,591	0,501

**Tabla 11: Correlaci3n entre la composici3n corporal y la funci3n motora en pacientes UCMD no ambulantes.** En esta tabla se muestran los valores del coeficiente de correlaci3n de Pearson ( $r$ ) entre las variables que expresan los cambios de composici3n y distribuci3n corporal y aquellas que nos informan sobre la funci3n motora y de calidad de vida de los pacientes. Los valores de  $r$  que superaron el n3mero 0,600 se marcaron en rojo claro. Se calcul3 la significaci3n estadística de cada correlaci3n mediante el test  $t$  de Student de manera bilateral, \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$ .

En el caso de los pacientes no ambulantes, no se observ3 ninguna correlaci3n entre la cantidad total de masa grasa (FMI) y las pruebas funcionales a las que se les sometió. No obstante, la ratio entre la fracci3n de grasa situada en extremidades inferiores y superiores se correlacion3 positivamente con la puntuaci3n obtenida en la escala funcional PUL. Los coeficientes de correlaci3n de los índices que indican la cantidad y distribuci3n de tejido muscular fueron muy bajos por lo que result3 difícil estrechar una dependencia entre la masa muscular y las puntuaciones resultado de las pruebas funcionales en los pacientes no ambulantes.

En el caso de la puntuaci3n obtenida en el cuestionario PedsQL, se observ3 una correlaci3n positiva con el índice AFFMI. La puntuaci3n obtenida en los cuestionarios PedsQL realizados por los padres sobre la percepci3n de la calidad de vida de sus hijos se correlacion3 positivamente con la grasa de la regi3n androide y de manera significativa con el FMI y grasa de la zona del tronco.



**Figura 58: Correlación entre masa grasa y función motora o calidad de vida.** La gráfica de la izquierda muestra la correlación lineal entre la puntuación PUL y el Z-score de la ratio de grasa localizada en piernas respecto brazos y la gráfica de la derecha muestra la correlación lineal entre la puntuación PedsQL y el Z-score FMI. Se indican los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el valor  $P$ .

### 5.3.2 Correlación entre la composición corporal y el perfil de adipoquinas

La siguiente tabla muestra el análisis de correlación entre la cantidad y distribución del tejido adiposo y muscular y los valores de adipoquinas presentes en suero de pacientes UCMD ambulantes.

#### Pacientes UCMD

	Leptina	Adiponectina HMW	RBP4
Z-score BMI	0,942	0,269	0,110
Z-score Grasa Tronco	0,960	0,686	-0,478
Z-score Grasa piernas/brazos	0,908	0,548	-0,244
Z-score Magro piernas/brazos	0,687	0,882	-0,510
Z-score FMI	0,992	0,619	-0,409
Z-score LMI	-0,959	0,354	-0,360
Z-score AFFMI	0,879	0,822	-0,157
Z-score Androide	1,000**	0,485	-0,151
Z-score Ginecoide	1,000*	0,411	-0,206
Z-score A/G	0,996	0,479	-0,005
Z-score Grasa piernas	0,994	0,385	-0,232
Leptina	1,000	0,430	-0,166
Adiponectina HMW	0,430	1,000	-0,821
RBP4	-0,166	-0,821	1,000

**Tabla 12: Correlación entre la composición corporal y el perfil de adipoquinas en pacientes UCMD no ambulantes.** En esta tabla se muestran los valores del coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables que expresan los cambios de composición y distribución corporal y aquellas que nos informan sobre la cantidad de adipoquinas circulantes en suero. Los valores de  $r$  que superaron el número 0,600 se marcaron en rojo claro. Se calculó la significación estadística de cada correlación mediante el test  $t$  de Student de manera bilateral, \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$ .

La leptina fue la adipoquina cuantificada en suero que mayor número de correlaciones mostró con las variables obtenidas del análisis de composición corporal. Correlacionó de manera positiva para todas aquellas variables relacionadas con la cantidad y distribución del tejido adiposo, sobretodo y de manera significativa con los indicadores de grasa en las regiones androide y ginecoide.

De manera opuesta, la leptina correlacionó negativamente con el LMI. En cambio hubo una correlación positiva entre los valores de leptina y los siguientes indicadores de distribución de masa muscular: ratio de tejido magro piernas/brazos y AFFMI.

En el caso de la adiponectina HMW, se apreció una correlación positiva entre sus valores en suero de pacientes UCMD ambulatorios y el FMI y la cantidad de masa grasa en el tronco, no obstante esta correlación no alcanzó significación estadística. Una correlación aún más robusta fue advertida cuando se compararon los valores de adiponectina HMW y la ratio de tejido magro piernas/brazos y el índice AFFMI.

**Pacientes BM**

Todos los pacientes BM incluidos en este estudio conservaban la deambulación en el momento del estudio por lo que fueron analizados juntos a diferencia de los UCMD.

Como se aprecia en la siguiente tabla, no se hallaron valores de *r* suficientemente elevados para establecer una correlación entre la composición corporal y los valores de adipoquinas en suero en los pacientes BM.

	Leptina	HMW Adiponectina
BMI	0,451	0,358
Z-score Grasa Tronco	0,534	0,451
Z-score Grasa piernas/brazos	-0,316	0,458
Z-score Magro piernas/brazos	-0,192	0,479
Z-score FMI	0,196	0,474
Z-score LMI	0,373	0,028
Z-score AFFMI	0,224	0,069
Z-score Androide	0,485	0,270
Z-score Ginecoide	-0,015	0,130
Z-score A/G	0,534	0,078
Z-score Grasa piernas	-0,146	0,281
Leptina	1,000	0,053
Adiponectina HMW	0,053	1,000

**Tabla 13: Correlación entre la composición corporal y el perfil de adipoquinas en pacientes BM.** En esta tabla se muestran los valores del coeficiente de correlación de Pearson (*r*) entre las variables que expresan los cambios de composición y distribución corporal y aquellas que nos informan sobre la cantidad de adipoquinas circulantes en de los pacientes. Los valores de *r* que superaron el número 0,600 se marcaron en rojo claro. Se calculó la significación estadística de cada correlación mediante el test *t* de Student de manera bilateral, \**P*<0,05 y \*\**P*<0,01.

### 5.3.3 Correlación entre la función motora y el perfil de adipoquinas

#### Pacientes UCMD ambulantes

Hasta el momento hemos analizado la correlación existente entre los cambios de composición corporal y la función motora y en paralelo, la composición corporal y el perfil de adipoquinas tanto en pacientes UMCD (ambulantes y no ambulantes) y BM.

En un último estudio de correlación, se quiso estudiar las correlaciones entre la función muscular y el perfil de adipoquinas en suero.

En los pacientes ambulantes, del mismo modo que la leptina mostró una estrecha correlación con la cantidad de masa grasa, especialmente aquella localizada en la región androide y ginecoide y la ratio piernas/brazos y en paralelo estos depósitos de grasa correlacionaron con peores puntuaciones en las escalas funcionales MFM y NSAA, pudimos observar tal y como se muestra en esta tabla inferior, como los valores de leptina correlacionaron negativamente con la puntuación obtenida en las escalas MFM y NSSA. Asimismo, se observó una correlación positiva entre el tiempo que tardaron los pacientes en subir y bajar 4 escalones y deambular 10 metros, siguiendo la misma tendencia que las correlaciones observadas entre los depósitos de masa grasa y el tiempo en realizar estas mismas pruebas. Finalmente, la prueba funcional 6MWT, la cual mostró una correlación negativa con la cantidad de masa grasa presente en piernas, correlacionó negativamente con los valores de leptina en los pacientes UCMD ambulantes.

El PedsQL fue otro de los factores que correlacionó positivamente con los valores de leptina así como hicieron para la cantidad de masa grasa estrechamente relacionada a su vez con la leptina. En el caso de la adiponectina HMW y el RBP4, no se advirtió ninguna correlación con la función física de los pacientes UCMD ambulantes.

	Leptina	Adiponectina HMW	RBP4
6MWT	-0,956	0,256	0,225
Subir 4 escalones	0,923	0,379	-0,566
Bajar 4 escalones	0,936	0,299	-0,558
Deambular 10 m	0,990	0,075	-0,147
MFM	-0,964	0,012	0,313
NSAA	-0,992	0,133	-0,049
PedsQL	0,986	0,574	-0,434
PedsQLPadres	0,998*	0,371	0,012
Leptina	1,000	0,430	-0,166
Adiponectina HMW	0,430	1,000	-0,821
RBP4	-0,166	-0,821	1,000

**Tabla 14: Correlación entre la composición corporal y el perfil de adipoquinas en pacientes BM.** En esta tabla se muestran los valores del coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables que expresan los cambios de composición y distribución corporal y aquellas que nos informan sobre la cantidad de adipoquinas circulantes en de los pacientes. Los valores de  $r$  que superaron el número 0,600 se marcaron en rojo claro. Se calculó la significación estadística de cada correlación mediante el test  $t$  de Student de manera bilateral, \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$ .





## **6 DISCUSIÓN**

---



En esta tesis se ha demostrado el papel del colágeno VI en la regulación de la homeostasis de la glucosa en un sistema *in vitro* y se ha estudiado *in vivo*, en el contexto de miopatías relacionadas con déficit de colágeno VI, cambios en la cantidad y distribución de los dos principales tejidos reguladores de captación de glucosa, el tejido adiposo y muscular demostrando una posible implicación del colágeno VI en la regulación de ambos tejidos.

En relación con los estudios de captación de glucosa llevados a cabo *in vitro* en distintas líneas celulares tratadas con colágeno VI han revelado que, efectivamente el colágeno VI es capaz de promover por si solo un aumento en la captación de glucosa de un modo dosis-dependiente después de exposiciones largas (16 horas). El impacto del tratamiento con colágeno VI en la captación de glucosa fue observado tanto en miotubos como adipocitos, representando los principales tejidos involucrados en la captación de glucosa; el tejido muscular y el tejido adiposo (Dimitriadis et al., 2011) (Rosen et al., 2006). Además, el efecto del colágeno VI observado en todas las líneas celulares empleadas es independiente a la acción de la insulina ya que tiene lugar incluso sin la coestimulación de esta. Además la captación de glucosa, aunque no siempre de manera estadísticamente significativa, fue mayor en todas las líneas estudiadas al tratar solo con colágeno VI en comparación al tratamiento solo con insulina.

Por otra parte, este efecto solo tiene lugar cuando el colágeno VI se encuentra en forma soluble, pero no inmovilizado. Esta última observación, junto a los diversos trabajos, que atribuyen un papel señalizador a la endotrofina en diversos contextos (Park et al., 2012)(Sun al., 2014), sugiere que posiblemente, sea este fragmento C-terminal del colágeno VI el responsable de esta acción. Así lo demostraron las mediciones de captación de glucosa realizadas tras un tratamiento con endotrofina, la cual de un modo dosis-dependiente similar al observado con el colágeno VI, fue capaz de producir el mismo efecto en miotubos C2C12 en cultivo.

El efecto del colágeno VI en la captación de glucosa fue contrastado con el efecto de otros colágenos a las mismas dosis y tiempos de tratamiento usados para el colágeno VI. Los colágenos estudiados fueron el colágeno de tipo I y el colágeno de tipo V. El primero de ellos se escogió por ser el principal tipo de colágeno fibrilar e interaccionar con el colágeno VI (Bonaldo et al., 1990), además había sido usado en paralelo al colágeno VI en estudios donde medían los efectos mitogénicos de ambos colágenos a través de la activación de vías celulares (Rühl et al., 1999) (Rühl et al., 1999).

El colágeno de tipo V aun y ser también un colágeno fibrilar como el de tipo I, es más corto y se sitúa cerca de la membrana basal como lo hace el colágeno VI (Sanes, 1982). Otro de los motivos que nos impulsó a estudiar sus efectos en la captación de glucosa en comparación al colágeno VI fue la existencia de estudios realizados en ratones deficientes en la cadena  $\alpha 3$  del colágeno V

## DISCUSIÓN

en el contexto metabólico. Dichos estudios han mostrado un aumento en la tolerancia a la glucosa, a la sensibilidad a la insulina y un menor porcentaje de adiposidad en el modelo deficiente respecto a ratones controles, poniendo de manifiesto la implicación de la  $\alpha 3V$  en la homeostasis de la glucosa (Huang et al., 2011).

Nuestro estudio demostró que el colágeno I soluble empleado a las dosis y tiempos ensayados no fue capaz de producir ningún efecto en la captación de glucosa *in vitro* ni en miotubos ni en adipocitos, a excepción de un pequeño aumento a la dosis de 1mg/l en miotubos LHCN-M2. Por el contrario, el colágeno V sí que fue capaz de producir un aumento en la captación de glucosa en la línea LHCN-M2, en contraposición a su posible papel participando en la intolerancia a la glucosa y resistencia a insulina propuesto en trabajos anteriores (Huang et al., 2011). Si bien este efecto no fue dosis-dependiente, fluctuando según la concentración empleada y no pudo ser reproducido en las demás líneas miogénicas y adipocitos.

Las determinaciones de síntesis de glucógeno en miotubos LHCN-M2 tratados con colágeno VI nos mostraron como el incremento en la captación de glucosa observado iba acompañado de un incremento en la síntesis de glucógeno indicando que una parte de la glucosa captada por los miotubos de la línea LHCN-M2 se transforma en glucógeno. No obstante, no se pudo corroborar dicho efecto al ser analizado en miotubos de la línea C2C12. Dado que el aumento en la síntesis de glucógeno en miotubos LHCN-M2 fue menor a la proporción de glucosa captada respecto el control en esta línea, así como la ausencia de síntesis de glucógeno después de un tratamiento con colágeno VI en los miotubos C2C12, estimamos que, en paralelo de la proporción de glucosa que se almacena en forma de glucógeno, posiblemente otra parte de la glucosa captada en ambas líneas sea destinada a otros procesos metabólicos como puede ser su oxidación mediante el proceso de glicolisis, la síntesis de triglicéridos mediante lipogénesis o la producción de lactato mediante la fermentación láctica (Kelley et al., 1990) (Phillips et al., 1996).

Con el objetivo de evaluar si la ausencia de síntesis de glucógeno en la línea C2C12 era debida a una menor activación de la vía de glucogenogénesis se analizaron por *Western blot* los niveles de la quinasa glucógeno sintasa (GS), la cual media la síntesis de glucógeno ante un estímulo de insulina mediante GSK3 y la presencia de la molécula glucosa-6- fosfato obtenida a partir de la fosforilación,, mediante la enzima hexoquinasa, de la glucosa captada (Bouskila et al., 2008). Tras el tratamiento con colágeno VI pudimos ver un aumento en la fosforilación de GS, lo cual se traduce en una inactivación de la enzima respecto la condición basal y, por lo tanto, una disminución de la síntesis de glucógeno. Estos resultados explicarían porque no advertimos cambios en la síntesis de glucógeno en los miotubos C2C12 a diferencia de los hallazgos en las

determinaciones de la síntesis de glucógeno en LHCN-M2. La GSK3 no es la única quinasa capaz de regular la actividad de GS, sino que existen nueve sitios de fosforilación en la proteína GS a la que se pueden unir otras quinasas como la PKA, AMPK, CaMKII, entre otras, que mediaran su inactivación mediante su fosforilación (Palm et al., 2013). Dado que el anticuerpo usado para la detección del estado de fosforilación de GS en estos experimentos solo reconocía los niveles de GS cuando esta estaba fosforilada en el residuo Ser640, no podemos descartar que exista una inactivación de la quinasa provocada por la fosforilación de otro de los nueve residuos existentes causada por la actividad de una quinasa distinta a GSK3. La medición en paralelo de la actividad de la GS en miotubos LHCN-M2 y C2C12 nos podría proporcionar una representación del efecto del colágeno VI en la regulación de la síntesis de glucógeno a través de la activación de GS independientemente de la quinasa implicada en esta activación.

Atribuimos las diferencias observadas entre líneas celulares al propio mecanismo de utilización de la glucosa en cada tipo celular aun tratándose en ambos casos de líneas miogénicas.

En vista de los resultados obtenidos, se realizó una determinación de la producción de lactato en miotubos C2C12 con el objetivo de averiguar si la glucosa captada después de la estimulación con colágeno, de manera alternativa a la síntesis de glucógeno, era fermentada a ácido láctico por la célula muscular (datos no mostrados). Un solo experimento se usó para determinar la producción de lactato en el medio de cultivo de los miotubos sometidos a los mismos tratamientos con colágeno y/o insulina que los realizados en los cultivos celulares usados para estudiar la fosforilación de la GS por *Western blot*. No parecieron existir diferencias entre la cantidad de lactato presente en el medio de los miotubos tratados con colágeno VI respecto los controles. No obstante, dada la falta de réplicas no se pudo validar la significancia estadística de las variaciones entre muestras.

Todas estas observaciones apuntan a un papel señalizador de la molécula de colágeno VI. Aunque no ha sido estudiado hasta el momento su implicación en el contexto del metabolismo de la glucosa en un modelo celular como el empleado en esta tesis, son varios los trabajos que relacionan el colágeno VI con funciones de señalización, principalmente en el contexto del cáncer (Chen, 2013). Si bien es cierto, que también existen evidencias previas en modelos animales de su participación en procesos metabólicos que incluyen la resistencia a insulina y la proliferación del tejido adiposo, los mecanismos intracelulares responsables son aún desconocidos (Khan et al., 2009).

Buscando el mecanismo por el cual el colágeno VI soluble y la ETP en miotubos y adipocitos da lugar a un aumento en la captación de glucosa, se decidió, en primer lugar, estudiar si dicho

## DISCUSIÓN

efecto podía ser resultado de la interacción del colágeno VI con receptores integrinas transmembrana que a su vez, activan la quinasa ILK encargada de activar cascadas de señalización involucradas en numerosos procesos celulares.

Efectivamente, los estudios de captación de glucosa realizados usando un inhibidor de la ILK conjuntamente con el tratamiento de colágeno VI y ETP demostraron que ambas moléculas pueden estar promoviendo sus efectos en el metabolismo de la glucosa a través de la regulación de señales mediadas por integrinas y que la inhibición de la quinasa ILK es capaz de revertir estos efectos. Dado que no se obtuvieron cambios en los niveles totales y fosforilados de los dos de los efectores de la ILK, Akt y GSK3 $\alpha/\beta$ , después de un tratamiento con colágeno solo o en conjunto con el inhibidor de ILK, asumimos que estas quinasas no median dicho efecto.

Una de las principales vías que regulan la captación de glucosa en células musculares y adipocitos es la vía de señalización de insulina PI3K/Akt, por lo que decidimos estudiar si el colágeno VI podía estar ejerciendo su acción a través de esta vía.

Como hemos visto en los estudios de captación de glucosa aún y demostrar que el colágeno VI por si solo es capaz de aumentar de manera significativa la captación de glucosa en miotubos de la línea LHCN-M2, estos no mostraron una buena respuesta a la insulina. En contraposición, los miotubos C2C12 y adipocitos sí exhibieron una buena respuesta tanto a colágeno VI como a la insulina. Por este motivo se determinó estudiar impacto del colágeno VI en la vía de señalización de PI3K/Akt en miotubos C2C12 así como adipocitos 3T3-L1.

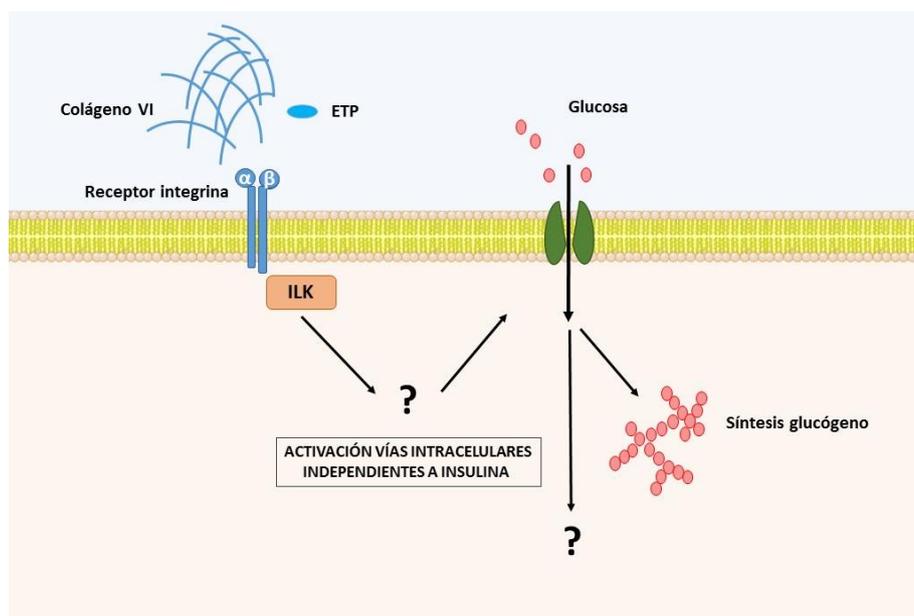
Aunque todas las proteínas estudiadas veían incrementados sus niveles de fosforilación después de una estimulación aguda con insulina, mostrando una buena sensibilidad a insulina por parte de los miotubos C2C12 y adipocitos 3T3-L1, no pudimos observar grandes cambios tras el tratamiento con colágeno VI.

En el caso de los miotubos C2C12, el colágeno VI produjo una disminución tanto en los niveles fosforilados, como los totales de GSK3 $\alpha/\beta$ , un sensor que impulsa la síntesis de glucógeno bajo un estímulo de insulina (Palm et al., 2013). No obstante, ambos efectos fueron muy discretos (**Figura 26**) y opuestos al efecto del colágeno VI en la síntesis de glucógeno que, aun y no ser estadísticamente significativo en miotubos C2C12, si lo fue en los LHCN-M2.

En los adipocitos 3T3-L1, por el contrario pudimos ver ligeros cambios en la proteína Akt. Concretamente, vimos una reducción significativa de sus niveles fosforilados y un aumento, aunque no estadísticamente significativo de los niveles de proteína total. La ratio entre los niveles de proteína fosforilada y total no resultó alterada.

Esta falta de cambios significativos en la vía de PI3K/Akt activada por insulina coincide con la acción independiente a insulina del colágeno VI en la captación de glucosa y en concordancia con la ausencia de cambios en la fosforilación de Akt y GSK $\alpha/\beta$  después del tratamiento conjunto de colágeno VI con el inhibidor de ILK, por lo que podemos concluir que muy posiblemente, esta vía no sea la responsable de mediar dicho efecto.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, pensamos que el colágeno VI, cuando menos en miotubos C2C12, podía estar ejerciendo su efecto a través de la vía de señalización de AMPK, activada en músculo bajo diversas situaciones donde la energía celular se ve disminuida (Coughlan et al., 2014). Aunque no se obtuvieron cambios significativos en AMPK, sí que hubo una tendencia a incrementar sus niveles, tanto de proteína fosforilada como total, después del tratamiento con colágeno VI. Sin embargo estas tendencias no son suficientes para explicar el mecanismo por el cual el colágeno VI desempeña su papel en la homeostasis de la glucosa en la célula muscular.



**Figura 39: Modelo propuesto del efecto del colágeno VI en la regulación de la homeostasis de la glucosa en miotubos y adipocitos *in vitro*.** Representación esquemática de la unión de la molécula de colágeno VI y la ETP a receptores integrina, cuyo dominio  $\beta 1$  interactuará con la quinasa ILK. La ILK es capaz de transducir las señales del colágeno VI que producirán la activación de vías intracelulares que en último término producirán la captación de glucosa extracelular, una parte de la cual se almacenará en forma de glucógeno. Las vías implicadas en este efecto son aún desconocidas.

A partir de estos resultados en modelos *in vitro* quisimos ir un paso más allá y estudiar las mismas proteínas involucradas en las vías de captación de glucosa de PI3K/Akt y AMPK, así como aquellas proteínas impulsoras de la síntesis de glucógeno, en músculo de pacientes UCMD en

## DISCUSIÓN

relación a músculo de individuos sanos. Pese a que se apreciaron tendencias relacionadas con aumentos en los niveles de distintas proteínas como fueron la proteína total y fosforilada de Akt y GS, GSK3 $\alpha/\beta$  total y AMPK fosforilada, ninguno de ellos resultó estadísticamente significativo, posiblemente debido a la variabilidad entre muestras. Proponemos que esta variabilidad puede estar asociada a la edad y el estadio de la enfermedad en el momento en que había sido realizada la biopsia (Paco et al., 2012). Sin embargo, esta es una limitación comúnmente presente en los estudios con muestras humanas, sobre todo cuando se trata de enfermedades raras en la población infantil por lo que consideramos que no debemos menospreciar las tendencias observadas e intentar reclutar un mayor número de muestras dentro de lo posible para caracterizar de manera más precisa estos cambios.

A diferencia de lo mencionado hasta ahora, el estudio de los niveles de proteína GLUT1 en el músculo de los pacientes UCMD mostró un aumento significativo respecto el músculo de individuos controles, mientras que la proteína transportadora GLUT4 a pesar de mostrar un leve aumento en sus niveles en músculo, este no resultó significativo (datos no mostrados).

El GLUT4 es el principal transportador encargado de mediar la captación de glucosa en la célula muscular a través de las vías mencionadas hasta el momento (ALVIM et al., 2015). Si bien es cierto que distintos estudios apuntan al GLUT1 como uno de los transportadores involucrados en el transporte basal de glucosa en músculo. Dichos estudios muestran que tanto modelos de ratón con sobreexpresión de GLUT1 en músculo esquelético como mioblastos L6 con sobreexpresión de GLUT1 presentan un aumento en la captación de glucosa basal (Marshall et al., 1993) (Robinson et al., 1993), además, se han encontrado niveles reducidos de proteína GLUT1 en músculo esquelético de pacientes con diabetes de tipo 2 (Ciaraldi et al., 2015). Una hipótesis que explicaría este aumento de GLUT1 en el músculo de los pacientes UCMD, en relación al papel el colágeno VI en la homeostasis de la glucosa, sería que estos pacientes presentan una mayor captación de glucosa en estado basal como consecuencia de una mayor expresión constitutiva de GLUT1 en la membrana celular, a diferencia de GLUT4, cuyos niveles no se encuentran tan incrementados.

Nuestros estudios de transcriptómica en músculo de pacientes UCMD (Paco et al., 2013) no pusieron de manifiesto cambios en los niveles de ARNm del GLUT1 en contraposición a los cambios a nivel de proteína obtenidos en este trabajo. Sin embargo, algo parecido ocurrió en el estudio de Ciaraldi y compañeros (Ciaraldi et al., 2015), donde aun viendo cambios a nivel de proteína de GLUT1, estos no se correlacionaron con cambios en los niveles de ARNm, proponiendo que estas diferencias pueden ser debidas a cambios traduccionales o postraduccionales (Taha et al., 1999). Sorprendentemente, el estudio de expresión génica por

qRT-PCR en miotubos LHCN-M2 tratados con colágeno VI realizado en este trabajo, mostró un aumento significativo en la expresión de *SLC2A1*, gen codificante para GLUT1, aunque no fuimos capaces de examinar cambios en la cantidad de proteína GLUT1 en estas células. Estos datos nos pueden estar indicando que el colágeno VI es capaz de producir su efecto activando la captación de glucosa *in vitro* y, tal vez, *in vivo*, a través de cambios de expresión génica que, no obstante, variaran en función del modelo biológico estudiado.

Estas observaciones conjuntamente a los cambios de expresión de proteínas totales medidas por *Western blot*, así como el efecto a largo plazo (16 horas) del colágeno VI en la captación de glucosa, nos condujeron a la realización de un análisis global de expresión génica en miotubos C2C12 tratados con colágeno VI soluble en comparación con miotubos no tratados.

Los primeros resultados obtenidos mostraron una gran variabilidad en los niveles de expresión génica entre muestras de un mismo grupo, lo que provocó que no se pudiera establecer un correcto agrupamiento entre las réplicas de cada grupo para realizar el estudio estadístico de las diferencias entre el grupo tratado y no tratado. Dada la inadvertencia de fallos durante el procedimiento técnico del microarray, se sopesó la posibilidad de cambios en el nivel de diferenciación de los cultivos de miotubos usados para la obtención de ARNm como foco de la variabilidad observada. Con tal de evaluar esta posibilidad, se estudió mediante qRT-PCR el nivel de expresión del gen *Myog* codificante para el factor de transcripción miogenina, usado como marcador de la diferenciación de mioblastos a miotubos (Faralli et al., 2012) en cada una de las muestras de ARNm obtenidas para el microarray. Dichas determinaciones nos confirmaron que la diferenciación de todos y cada uno de los cultivos empleados en este experimento se diferenciaron de manera semejante, sin apenas variabilidad entre ellos por lo que se descartó esta hipótesis como causante de la dispersión de genes expresados diferencialmente entre las seis muestras estudiadas.

El nuevo análisis de los datos obtenidos en el microarray se basó en la eliminación de elementos que dificultaban la interpretación bioinformática de los resultados obtenidos, principalmente secuencias nucleotídicas cuyo producto es a día de hoy desconocido o no funcional, miARNs y genes codificantes de enzimas ribosomales y se prescindió de una de las muestras tratadas con colágeno VI. Los datos analizados sobre la base de un  $q < 0,1$  como límite de significación mostraron la existencia de 57 genes diferencialmente expresados en las muestras tratadas con colágeno VI. Con el objetivo de identificar vías de señalización y procesos biológicos que pudieran explicar el papel del colágeno VI en la captación de glucosa basado en estas diferencias se realizó un análisis de enriquecimiento funcional. En proceso biológico en el que más genes

## DISCUSIÓN

vieron alterada su expresión después de un tratamiento con colágeno VI fue la vía de fosforilación oxidativa.

La fosforilación oxidativa es el proceso por el cual la mitocondria es capaz de producir energía en forma de ATP a partir de distintos sustratos procedentes de diversos procesos catabólicos como la glucólisis o la  $\beta$ -oxidación de lípidos entre otros. Este proceso está mediado por una serie de complejos enzimáticos y transportadores de electrones. Los complejos involucrados están formados por distintas subunidades codificadas tanto por genes nucleares como mitocondriales (Benard et al., 2008). Varios de los genes diferencialmente expresados en nuestro estudio codificaban para varias de estas subunidades. En concreto, se observaron cambios de expresión en un total de cinco genes codificantes para chaperonas involucradas en el correcto ensamblaje de los complejos I y IV, así como proteínas que componen subunidades de estos mismos complejos, además de una proteína ribosómica mitocondrial.

La validación por PCR en tiempo real de estos cambios mostró discrepancias en la expresión génica reportada con ambas técnicas. Aun y la filtración de los datos obtenidos en el primer análisis, la comparativa entre ambas técnicas reveló tanto diferencias en el nivel de cambio de los genes estudiados así como en la dirección de estos cambios. Numerosos artículos centrados en establecer la correlación entre la expresión génica de ambas técnicas han revelado peores correlaciones cuando el nivel de cambio hallado inicialmente en el estudio de microarray es inferior a 1.4 (Morey et al., 2006), mientras que otros consideran un cambio inferior a 2 como un factor causante de peores correlaciones entre ambas técnicas (Etienne et al., 2004). Por consiguiente, atribuimos las diferencias encontradas en la validación de los resultados de microarray a la sutileza de los cambios de expresión génica entre muestras tratadas y no tratadas.

Aun y la dificultad de corroborar los cambios obtenidos mediante el estudio de microarray, consideramos conveniente analizar en más detalle la relación entre la función *in vitro* del colágeno VI y las alteraciones en la expresión génica de proteínas mitocondriales. Para ello, se estudió el impacto de un tratamiento con colágeno VI en la función mitocondrial de miotubos C2C12 mediante la medición del consumo de oxígeno. Prácticamente no se observaron cambios en la tasa de consumo de oxígeno en rutina, así como tampoco en la capacidad máxima de respiración de la mitocondria. El mayor cambio observado tras el tratamiento mantenido con el colágeno VI tuvo lugar después de inhibir el complejo ATP sintasa, indicando una disminución del *proton leak* que se traduce en un mayor acoplamiento a la fosforilación oxidativa y el transporte de protones. En situaciones fisiológicas, los electrones procedentes de la oxidación de los sustratos de numerosos procesos catabólicos circulan a través de la cadena respiratoria creando un bombeo de protones a través de los distintos complejos del sistema de fosforilación

oxidativa, no obstante una parte de los protones involucrados en el gradiente electroquímico dejan de ser utilizados para la síntesis de ATP a través del complejo V y son capaces de atravesar la membrana mitocondrial interna con la consecuente reducción en la síntesis de ATP (Divakaruni et al., 2011). Un mayor acoplamiento entre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones implica una mayor eficiencia por parte de la mitocondria para producir ATP a partir de los sustratos oxidados.

No obstante, del mismo modo que en los estados de rutina y de capacidad máxima y a pesar de las diferencias observadas, este cambio no fue significativo y apenas alcanzó una diferencia del 16% respecto la condición control.

Se calcularon las *Flux Control Ratios* con el objetivo de obtener información detallada sobre el grado de acoplamiento. Los resultados del estudio de las distintas *ratios* nos informaron en primer lugar que los miotubos C2C12 tratados con colágeno VI disponían de una menor capacidad reserva, pero un mayor porcentaje de esta reserva estaba siendo utilizada en el estado de rutina en comparación con los miotubos controles. No obstante, aunque el tratamiento con colágeno VI parecía incrementar la utilización de esta reserva, un menor porcentaje de esta reserva iba destinada a la síntesis de ATP, en consonancia a los valores del *Leak Respiratory control ratio* los cuales nos indicaron que existía un mayor consumo de oxígeno no ligado a la fosforilación oxidativa respecto la capacidad máxima. No obstante, estos resultados estuvieron en contraposición a la disminución de *proton leak* que se observó previamente, posiblemente por la ausencia de cambios significativos en ninguno de los parámetros estudiados.

Aun y la interpretación realizada de todas las tendencias observadas en estos ensayos, dada la ausencia de cambios significativos así como las leves variaciones observadas después de la realización de cinco ensayos independientes con un alto número de réplicas, consideramos que el colágeno VI no ejerce su efecto en la captación de glucosa a través de alteraciones en la función mitocondrial.

El conjunto de datos obtenidos en relación a el efecto del colágeno VI en la homeostasis de la glucosa y el control de la expresión génica confirman que, en primer lugar, el colágeno VI soluble es capaz de inducir la captación de glucosa *in vitro* después de un tratamiento de 16 horas tanto en células musculares como adipocitos. Y que, parte de esta glucosa captada, se almacena en forma de glucógeno en los miotubos.

En segundo lugar, que este efecto es dosis dependiente y sucede sin la coestimulación con insulina y de manera independiente a la vía de señalización PI3K/Akt.

## DISCUSIÓN

Además hemos demostrado que no solo el colágeno VI es capaz de llevar a cabo esta función, sino que de manera independiente, su fragmento C-terminal, la ETP, es capaz de producir el mismo efecto en miotubos C2C12 confirmando su papel en la regulación del metabolismo de la glucosa.

Por otra parte, el colágeno VI es capaz de producir un incremento en la expresión del transportador GLUT1 en la línea celular C2C12 indicando que este podría ser el transportador mediador del efecto del colágeno VI en la captación de glucosa *in vitro*. Asimismo, el colágeno VI regula la expresión de genes involucrados en la fosforilación oxidativa, sin que esto tenga repercusiones en la funcionalidad de la mitocondria.

Considerando los resultados obtenidos en las determinaciones de captación de glucosa y el aumento del transportador de glucosa GLUT1 en músculo de pacientes UCMD, así como las evidencias de el papel del colágeno VI en la correcta expansión del tejido adiposo y la existencia de alteraciones en la cantidad de tejido graso descritas en ratones con ausencia de colágeno VI (Khan et al; 2009), fue de nuestro interés valorar como se podía ver afectada la cantidad y distribución de los principales tejidos reguladores de la captación de glucosa, el tejido adiposo y muscular, en un modelo humano con ausencia de colágeno VI. Las patologías de UCMD y BM se caracterizan por una ausencia parcial de colágeno VI tal y como se ha descrito detalladamente en el apartado de Introducción, por lo que pacientes de ambas distrofias nos sirvieron como modelo patológico para estudiar el papel del colágeno VI en la composición corporal humana.

Por tal de llevar las determinaciones de composición corporal en estos pacientes, la técnica escogida en esta tesis fue la absorciometría de doble energía (DXA) la cual nos confiere una serie de ventajas respecto otras técnicas de imagen usadas para el diagnóstico de las distrofias musculares (Bönnemann et al., 2014) (Díaz-Manera et al., 2015). La exploración por DXA nos permite obtener una imagen de cuerpo entero del paciente a partir de la cual seleccionamos áreas de interés para estudiar en cada una de ellas la cantidad (en gramos) de tejido magro y adiposo y la densidad mineral ósea (en gramos/cm<sup>3</sup>).

Su funcionalidad en el estudio de la composición corporal ha sido validada tanto en la población infantil como adulta (Helba et al., 2009)(Choi, 2016) (Seabolt et al., 2015). Se trata de una técnica muy usada en otras distrofias musculares, como en la DMD para el seguimiento de la pérdida de masa ósea derivada del tratamiento con corticoesteroides empleado para ralentizar el deterioro de la función motora y la fuerza muscular (Buckner et al., 2015). La principal ventaja de su uso, especialmente en la población infantil, es su seguridad. La radiación emitida es menor a la que podrían verse expuestos durante una radiografía convencional y, dado que el tiempo de

exploración no suele superar los 20 minutos (Seabolt et al., 2015), el paciente aun siendo de corta edad no requiere sedación a diferencia de la MRI, donde los pacientes más jóvenes necesitan ser sedados para facilitar la exploración con el riesgo de depresión respiratoria atribuido a los fármacos empleados que esto comporta (Arlachov et al., 2012). Además, supone una alternativa más económica en relación a otras técnicas (Briot, 2013).

De acuerdo a los resultados obtenidos, los grupos de pacientes UCMD y BM analizados presentaron una cantidad de masa grasa, expresada en FMI, significativamente superior a la población de referencia, especialmente en los grupos de hombres BM y las niñas UCMD. No obstante en el grupo UCMD esta variación no se relacionó con cambios significativos en el BMI en ninguno de los dos sexos, aunque ambos tenían un FMI significativamente elevado. Por el contrario, el aumento de FMI y BMI en los hombres BM fue muy significativo para ambos índices, pero no en el caso de las mujeres, cuyos FMI y BMI se mantuvieron dentro de los valores de la población de referencia.

Hay que tener en cuenta que, aunque en este caso, tanto el FMI como el BMI estuvieron corregidos por edad y sexo, el BMI no explica las contribuciones independientes de la masa grasa (FMI) y la masa magra (LMI). Esta relación discordante entre el valor de FMI y el BMI en los pacientes UCMD debe analizarse en consideración a la pérdida de masa magra (*Z-score* LMI) observada en estos pacientes, por lo que probablemente, el resultado combinado del incremento en el contenido de grasa y la disminución de masa magra observados sean los causantes de la ausencia de modificaciones en el BMI. Esto nos indica, que a diferencia de lo observado en distintas poblaciones infantiles sanas (Inokuchi et al., 2011) (Kakinami et al., 2014) (Gómez-Campos et al., 2016), en el contexto de miopatías relacionadas con déficit de colágeno VI, concretamente en la población UCMD, el *Z-score* BMI por sí solo puede no ser un indicador suficientemente informativo de la adiposidad y valores normales pueden estar enmascarando alteraciones en la proporción de tejidos adiposo y magro (Freedman et al., 2005), los cuales sí pueden ser correctamente analizados de manera independiente mediante la técnica de DXA. En los pacientes BM, por el contrario, dado que no observamos cambios significativos en el LMI en ninguno de los dos sexos (datos no mostrados), pero sí en el BMI de los pacientes con un FMI significativamente incrementado, asumimos que el BMI es un buen indicador de adiposidad.

Otra posibilidad, teniendo en cuenta evidencias observadas en el estudio anatomopatológico de biopsias musculares de pacientes UCMD (Jimenez-Mallebrera et al., 2005) así como en imágenes de resonancia magnética en UCMD y BM (Eugenio Mercuri, 2005) y otras distrofias musculares (Díaz-Manera, 2015) (Willis et al., 2014), es que el aumento de FMI frente la invariabilidad de los valores de BMI podría explicarse, en parte, por el proceso de infiltración de tejido adiposo

## DISCUSIÓN

en el músculo. Desafortunadamente, la técnica de DXA no nos permite distinguir depósitos de grasa intramusculares y no podemos determinar esta afirmación.

Al considerar el estado de ambulación de los pacientes, la gran mayoría de indicadores de cantidad de masa grasa total y en las distintas regiones presentaron un valor superior en aquellos pacientes que no caminaban respecto los que aun conservaban la deambulación. En los pacientes ambulantes los indicadores de masa grasa mostraron una gran correlación ( $R^2$ ) negativa con las puntuaciones de las pruebas funcionales MFM y NSAA. Del mismo modo una estrecha correlación positiva entre al cantidad de masa grasa y el tiempo dedicado a subir y bajar 4 escalones y andar 10 metros ponía de manifiesto la contribución del aumento tejido adiposo en el estado físico de los pacientes UCMD. En el grupo de pacientes no ambulantes no parecieron existir grandes correlaciones entre la cantidad de masa grasa y la puntuación obtenida en las pruebas funcionales. Posiblemente esto sea debido a los diferentes grupos musculares evaluados en las pruebas funcionales de pacientes ambulantes y no ambulantes, mientras que las regiones corporales exploradas por DXA fueron las mismas en ambos grupos. Las pruebas que se realizan a pacientes ambulantes evalúan ambos grupos de extremidades, mientras que las pruebas destinadas a los pacientes no ambulantes solo puntúan la función motora de brazos. Este dato conjuntamente al aumento de masa grasa en piernas existente en ambos grupos, nos podría indicar que tal vez la función motora de brazos esté mejor conservada que la de piernas por la menor influencia de la grasa en la región de extremidades superiores y este fuera el origen de las diferentes correlaciones entre función motora y masa grasa en ambos grupos de pacientes UCMD. Esto iría en conjunto con la atrofia muscular observada mediante MRI en pacientes UCMD, principalmente descrita en extremidades inferiores (Mercuri et al., 2005).

Un hallazgo sorprendente fue la correlación existente, tanto en pacientes ambulantes como no ambulantes, entre la cantidad de masa grasa y la puntuación PedsQL.

A diferencia de los test funcionales a los que son sometidos los pacientes para evaluar su función motora, el cuestionario de calidad de vida relacionada con la enfermedad (PedsQLT) tiene como propósito conocer la percepción del propio paciente del impacto de su estado de salud y la enfermedad en aspectos físicos, mentales y sociales de la vida diaria dentro de su contexto cultural y social (Eiser et al., 2001). Su uso se encuentra extendido en afectaciones crónicas en la población infantil y adolescente como son la obesidad (Moreira et al., 2013), diabetes de tipo 1 (Samardzic et al., 2016) u otras distrofias como la DMD (Landfeldt et al., 2016). Concretamente, el PedsQL utilizado en este trabajo fue específico para el módulo de enfermedades neuromusculares el cual comprende una evaluación específica de la relación con la familia, comunicación e incapacidades físicas que el paciente atribuye a su enfermedad. El hecho de que

en los pacientes UCMD existiera una peor percepción de calidad de vida relacionada con la enfermedad por parte del propio paciente y sus padres a mayor cantidad de masa grasa nos hace pensar que esta acumulación de grasa implica en definitiva una mayor dificultad para la realización de tareas cotidianas dada la estrecha correlación entre cantidad de grasa y puntuación de las escalas funcionales observada y, por lo tanto el paciente experimenta una mayor percepción de incapacidad física. Esta incapacidad que puede sentir el paciente en relación a compañeros o familiares sanos puede estar influyendo en sus relaciones familiares así como su seguridad mostrando un debilitamiento de sus habilidades comunicativas.

Meilleur y compañeros (Meilleur et al., 2014) ya estipularon en un estudio reciente que la función motora solo era uno de los factores influyentes en la calidad de vida de los pacientes UCMD, pero se desconocían que otros componentes de la enfermedad podían estar interviniendo en el empeoramiento de su calidad de vida. Nosotros, una vez más, proponemos que el aumento de tejido adiposo, y no solo la pérdida de masa muscular, contribuye en la calidad de vida de los pacientes, hecho que no se había considerado hasta el momento en el manejo de la patología. Por este motivo, creemos que el estudio del origen de este tejido adiposo así como su contribución a la fisiopatología de UCMD debería ser estudiado como posible diana de intervención en la clínica de la enfermedad.

En nuestro estudio, se compararon los cambios obtenidos en los pacientes UCMD con pacientes DMD para establecer la especificidad de dichos cambios. Los cambios en la cantidad de masa grasa siguieron un patrón muy parecido entre los pacientes ambulantes y no ambulantes de ambos grupos, siendo los no ambulantes los que presentaban mayor acumulación de grasa. Aunque el grupo UCMD, en comparación con los DMD, mostró unos valores más alejados de la misma población de referencia, los cambios atribuidos al estado de deambulación fueron mayores dentro del grupo DMD, mientras que en los pacientes UCMD estas diferencias nunca llegaron a ser significativas.

Para entender estas diferencias, hay que tener en cuenta algunas particularidades de la DMD que la convierten en una enfermedad mucho más homogénea que la UCMD. En primer lugar, la DMD es una enfermedad que solo afecta a niños, aunque se han descrito portadoras con sintomatología parecida a la DMD (Mercier et al., 2013), todos los pacientes DMD incluidos en nuestro estudio eran chicos. Por el contrario, la UCMD afecta tanto a niños como a niñas. En segundo lugar, la DMD presenta una edad de aparición de los primeros síntomas (alrededor de los 4 años) así como una edad de pérdida de la deambulación (10 años de edad) muy parecida en todos los pacientes (Falzarano et al., 2015), por lo que los pacientes analizados DMD de cada grupo comprendían un rango de edad muy similar entre ellos. Aunque la aparición de la UCMD

## DISCUSIÓN

queda restringida a los primeros años de vida, el efecto de la enfermedad sobre la capacidad de caminar es muy variable, existiendo pacientes que nunca llegan a andar y otros que pueden conservar la marcha durante toda la infancia (Yonekawa et al., 2015), como ocurre en nuestro grupo de pacientes analizado. Finalmente cabe reparar en el hecho de que todos los pacientes DMD incluidos en este estudio se encontraban en tratamiento con corticosteroides en el momento de las mediciones corporales. Ha sido demostrado que el tratamiento con corticoesteroides estabiliza la composición corporal de los pacientes DMD mediante el aumento de la masa magra (Vuillerot et al., 2014), por lo que puede suponer un sesgo en la comparación de pacientes de ambas patologías.

El análisis de cantidad de masa magra reveló una disminución generalizada en pacientes BM y UCMD, siendo mayor en estos últimos lo que está en consonancia con la severidad de la progresión clínica en cada forma, y por lo tanto, la debilidad muscular asociada. En los pacientes BM la masa muscular se vio reducida selectivamente en los miembros superiores con respecto a los miembros inferiores contrastando con el patrón de atrofia característico observado mediante MRI (Mercuri et al., 2005). Este patrón se caracteriza principalmente por una afectación en los músculos vasto lateral y medial, gastrocnemio medial, recto femoral y sóleo, todos ellos localizados en extremidades inferiores. Aunque si bien es cierto, los músculos de extremidades superiores también pueden verse afectados, principalmente el tríceps y músculos subescapulares (Díaz-Manera et al., 2015).

La coexistencia de un estado de sarcopenia basado en el AFFMI, en pacientes BM y UCMD, y un porcentaje de masa grasa incrementado respecto la población control según los estándares de trabajos anteriores (Baumgartner, 2000), demuestran la existencia de obesidad sarcopénica en nuestro grupo de pacientes reafirmando las observaciones de estudios anteriores realizadas en pacientes con mutaciones en colágeno VI, principalmente en BM, dado que solo un solo paciente UCMD fue estudiado hasta este momento (Toni et al., 2014) (Miscione et al., 2013). Aunque sin utilizar el término de obesidad sarcopénica, varios trabajos han descrito también en otros trastornos neuromusculares una disminución de la masa magra acompañada de un aumento de masa grasa a lo largo de la progresión de la enfermedad, como ocurre en la distrofia fascioescapulohumeral o la atrofia muscular espinal (Skalsky et al., 2008) (Sproule et al., 2009). En algunos casos, como ocurre en la distrófica miotónica, estos hallazgos también han sido correlacionados con una disminución de la función motora (Pruna et al., 2011).

Sorprendentemente, en el grupo UCMD, la disminución de LMI así como AFFMI fue mayor en los pacientes ambulantes respecto los no ambulantes, no obstante las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas en el caso del LMI. Los valores de ambos índices correlacionaron

positivamente con la puntuación obtenida en las pruebas funcionales MFM y NSAA, así como con los metros recorridos en 6 minutos en los pacientes ambulantes mostrando una función motora conservada en proporción a la cantidad de masa muscular.

La tendencia en los cambios de AFFMI y LMI fue opuesta en los DMD y solo los que ya habían perdido la capacidad de andar presentaron una reducción significativa de la masa magra para ambos índices.

Estas diferencias en el patrón de pérdida de masa magra en extremidades (AFFMI) entre pacientes ambulantes y no ambulantes con DMD y UCMD puede estar explicado por el patrón de atrofia propio de cada patología.

Nuestro grupo demostró a nivel histopatológico mediante microscopia la presencia de numerosas fibras atróficas caracterizadas por un diámetro reducido y por la presencia de pliegues en la membrana basal en pacientes UCMD. El diámetro de estas fibras fue de media menor al esperado por la edad de los pacientes, incluso en pacientes de corta edad, por lo que se trata de un proceso temprano que tiene lugar desde el inicio de la enfermedad (Paco et al., 2012) y al tratarse de una enfermedad congénita, esto puede ocurrir desde el primer año de vida.

La DMD en cambio, no suele presentar los primeros síntomas de debilidad muscular hasta los 4 años aproximadamente (Falzarano et al., 2015) y aunque la pérdida de deambulación suele ser parecida a los UCMD, estos últimos presentan mucha más variabilidad en este aspecto. La mayor parte de los pacientes DMD no ambulantes incluidos en este estudio tenían más de 12 años. Por otro lado, en nuestro grupo de pacientes UCMD se incluyen tres pacientes que nunca llegaron a andar y otros tres que la perdieron antes de los 10 años de edad. Proponemos que, tal vez las diferencias entre en el patrón de pérdida de masa magra entre pacientes ambulantes y no ambulantes DMD y UCMD sean debidas a que los pacientes UCMD presentan desde muy jóvenes una atrofia distal, mientras que los DMD no será hasta etapas más avanzadas de la enfermedad, cuando ya hayan perdido la deambulación, que esta atrofia sea más evidente como consecuencia del proceso dristrófico. Además, debemos tener en cuenta que todos los pacientes DMD estudiados seguían un tratamiento con cortisoesteroides que, como se comentó anteriormente, tiene la propiedad de ralentizar la pérdida de masa magra a lo largo de la progresión de la enfermedad. El hecho que los pacientes UCMD no ambulantes tengan menor pérdida de AFFMI debería ser corroborada en un estudio longitudinal donde se midiera a lo largo de los años el patrón de cambio de este índice.

Esta serie de resultados ponen de manifiesto la pérdida significativa de masa muscular y el incremento de la adiposidad corporal en pacientes con mutaciones en colágeno VI como un

## DISCUSIÓN

componente de la fisiopatología de las enfermedades UCMD y BM, aunque no conocemos con certeza el origen de estos cambios, así como su relación con alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Dadas las evidencias recapituladas hasta el momento en diferentes trabajos sobre papel del colágeno VI en la remodelación de la matriz extracelular que rodea el tejido adiposo (Nakajima et al., 2002), las mutaciones en colágeno VI en los pacientes UCMD y BM podrían resultar en alteraciones en la disposición y expansión del tejido adiposo a medida que este aumenta en sustitución al tejido magro, el cual se ve reducido durante la progresión de la enfermedad. Esta proliferación de tejido adiposo puede estar generando un componente metabólico y endocrinológico en estas distrofias no considerado hasta el momento, pero el cual podría influir en la severidad de ambas enfermedades reflejada a través del estado funcional. Un correcto control de parámetros bioquímicos en sangre como son la glucemia e insulinemia en estos pacientes nos ayudarían a conocer las consecuencias de estos cambios de composición corporal. Aun y no disponer de estos datos bioquímicos, las estrechas correlaciones observadas en este trabajo indican la utilidad de las mediciones de composición corporal como predictores del estado funcional y de calidad de vida de los pacientes, por lo que sería una herramienta muy útil para introducir en las visitas hospitalarias de control que realizan los pacientes periódicamente. Asimismo, la inclusión del estudio de composición corporal mediante DXA a lo largo de la progresión de la enfermedad de cada paciente nos proporcionaría una información muy útil para trazar con mayor precisión la historia natural de estas enfermedades.

En estudios previos de nuestro laboratorio, donde hemos demostrado un aumento en la expresión de los genes *LEP*, *ADIPOQ* y *RBP4*, codificantes para las adipoquinas leptina, adiponectina y *retinol binding protein 4* en biopsias de pacientes con déficit de colágeno VI (Paco et al; 2013). Estos antecedentes, conjuntamente a los resultados de este trabajo donde hemos mostrado un aumento generalizado en la cantidad del tejido adiposo, órgano encargado de secretar adipoquinas involucradas en distintos procesos metabólicos, nos alentaron a estudiar si los cambios observados en tejido adiposo de estos pacientes guardaban relación con los niveles circulantes de las adipoquinas nombradas.

La determinación de adipoquinas realizadas en suero de pacientes UCMD ha demostrado que estos presentan aumento muy significativo de los niveles de adiponectina HMW. Este resultado coincide con el aumento de los niveles de expresión del gen codificante para la adiponectina (*ADIPOQ*) en el músculo de pacientes UCMD obtenidos anteriormente por nuestro grupo (Paco et al., 2013). Además, las determinaciones llevadas a cabo en este estudio en pacientes DMD nos mostraron una reducción significativa de los niveles de adiponectina HMW, tanto en

referencia al grupo control como el grupo UCMD. Este hallazgo está en concordancia con estudios recientes en modelos de ratón de DMD, los cuales han manifestado que tanto los niveles de la proteína adiponectina en suero como de su ARNm en músculo se encuentran reducidos en comparación a ratones control (Hathout et al., 2014) (Abou-Samra et al., 2015). Por lo tanto, se confirma que el aumento de adiponectina HMW circulante es específico en pacientes UCMD, pero no en DMD.

Por lo que respecta a los niveles de leptina estudiados en suero de pacientes UCMD, estos se vieron incrementados, aunque no de forma significativa, tanto respecto los controles como respecto pacientes DMD. Este aumento correlacionó positivamente, como cabía esperar y tal y como está descrito (Yadav et al., 2013), con todos los indicadores de adiposidad obtenidos de las determinaciones de DXA. Resulta interesante la estrecha correlación negativa entre los niveles de leptina y la puntuación de las escalas funcionales MFM, NSAA y 6MWT y la correlación positiva entre los valores de leptina y los test cronometrados de función. Teniendo en cuenta la buena correlación entre los valores de leptina con la adiposidad presente en los pacientes y el efecto negativo de esta en la función motora, la leptina podría considerarse como un biomarcador de la función motora en estos pacientes. Del mismo modo que la puntuación obtenida en el cuestionario PedsQL correlacionó positivamente con los índices de adiposidad, la leptina también guardó una estrecha correlación con la percepción de la calidad de vida de los pacientes y sus padres, confirmando una vez más, el efecto negativo del aumento de tejido adiposo en esta patología.

Aunque en nuestros estudios previos de análisis de transcriptómica no fueron incluidos pacientes BM (Paco et al., 2013), en este trabajo se estudiaron tanto los niveles de leptina como de adiponectina HMW en suero de pacientes BM. Ninguna de las dos adipoquinas pareció verse alterada de manera significativa y sus niveles no mostraron correlación alguna con las valoraciones obtenidas del DXA, ni siquiera aquellas que describían un aumento en la cantidad de masa grasa. No obstante, existió una tendencia de acuerdo a un aumento en los niveles de ambas adipoquinas respecto el grupo control, por lo que hipotetizamos, que la ausencia de cambios significativos en el grupo BM puede ser debida al escaso número de pacientes disponibles para este estudio y que, con un grupo mayor en número, podríamos llegar a ver un aumento más destacado respecto el grupo control. De ser así, y teniendo en cuenta que nuestros pacientes UCMD y BM presentan un perfil de obesidad, la correlación entre los niveles de leptina y el aumento de masa grasa en ambos grupos irían de acuerdo a las evidencias descritas hasta el momento donde se ha descrito ampliamente un incremento de los niveles de leptina en

## DISCUSIÓN

pacientes obesos, tanto adultos como niños (Martos-Moreno et al., 2013). No obstante, sin conocer aun con certeza la causa, en pacientes obesos los niveles de adiponectina se encuentran reducidos (Asayama et al., 2003)(Kern et al. 2003), al contrario de lo observado en los pacientes UCMD y BM analizados en este trabajo y en estudios previos de nuestro equipo (Paco et al., 2013). Este dato nos podría estar indicando que en los pacientes con mutaciones en colágeno VI otro mecanismo, independiente al aumento de masa grasa, puede estar mediando el incremento de adiponectina tanto a nivel de expresión génica como en sus niveles circulantes.

Esta diferencia en los niveles circulantes de adipoquinas con cambios opuestos observados entre UCMD y DMD abre la ventana al uso de estas adipoquinas como biomarcadores específicos de UCMD. No obstante, debemos tomar esta hipótesis con cautela en primer lugar porque las poblaciones UCMD y BM estudiadas en esta tesis comprendían rangos de edad muy distintos por lo que fueron comparadas con dos poblaciones control diferentes. En segundo lugar, debemos tener en cuenta que factores como estadio puberal en el caso de los pacientes infantiles (Elias, 2012) (Falorni et al., 1997) (Xu et al., 2012), pueden influir de manera muy significativa en los niveles de adipoquinas circulantes. Del mismo modo que lo puede hacer el BMI o, según lo visto, el FMI tanto en pacientes infantiles como adultos (Koester-Weber et al., 2014) (Ronti et al., 2006). Desafortunadamente, no se dispuso para nuestro estudio de muestras pertenecientes a adultos con FMI similar al de los pacientes BM, lo que puede suponer un obstáculo para interpretar correctamente los resultados obtenidos. En el caso de los UCMD pudimos disponer de muestras de suero de controles con un BMI similar a los UCMD. No obstante, como hemos visto, el BMI de nuestros pacientes no se alejaba de los valores de la normalidad, mientras que sí lo hacía en FMI, por lo que la continuidad de este estudio debe retomarse en consideración a este descubrimiento.





## **7 CONCLUSIONES**

---



1. El colágeno VI soluble y la endotrofina provocan la captación de glucosa de un modo dosis y tiempo dependiente en miotubos LHCN-M2, C2C12, L6 y adipocitos SGBS.
2. El fragmento carboxilo terminal del colágeno VI (ETP) es capaz, por si solo, de producir un aumento en la captación de glucosa dosis y tiempo dependiente en miotubos C2C12.
3. El efecto del colágeno VI y la ETP es independiente a la estimulación de insulina y dependiente de la quinasa ligada a integrinas (ILK).
4. Efecto del colágeno VI en la captación de glucosa no se produce a través de la vía de señalización PI3K/Akt.
5. El colágeno soluble VI aumenta la síntesis de glucógeno en miotubos LHCN-M2.
6. El colágeno VI soluble ejerce una regulación positiva sobre los niveles de expresión del gen *SLC2A1* en miotubos LHCN-M2.
7. El colágeno VI soluble ejerce una regulación negativa sobre los niveles de expresión de genes codificantes para proteínas mitocondriales involucradas en el proceso de fosforilación oxidativa en miotubos C2C12. Estos cambios no se traducen en alteraciones significativas de la función mitocondrial.
8. La proteína transportadora de glucosa GLUT1 se encuentra incrementada en el músculo de los pacientes UCMD.
9. Los pacientes UCMD y BM presentan una disminución en la cantidad de masa magra y un aumento en la cantidad de masa grasa.
10. El aumento de masa grasa en pacientes UCMD se correlaciona negativamente con el estado funcional y la calidad de vida del paciente.
11. Los pacientes UCMD presentan un aumento significativo de los niveles circulantes en suero de la adiponectina de alto peso molecular (HMW).



## **8 BIBLIOGRAFIA**

---



- Abou-Samra, M., Lecompte, S., Schakman, O., Noel, L., Many, M. C., Gailly, P., & Brichard, S. M. (2015). Involvement of adiponectin in the pathogenesis of dystrophinopathy. *Skeletal Muscle*, 1–17. <http://doi.org/10.1186/s13395-015-0051-9>
- Aigner, T., Hambach, L., Söder, S., Schlötzer-Schrehardt, U., & Pöschl, E. (2002). The C5 domain of Col6A3 is cleaved off from the Col6 fibrils immediately after secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(2), 743–8. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6227>
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B., & Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current Biology : CB*, 7(4), 261–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9094314>
- Alkhouli, N., Mansfield, J., Green, E., Bell, J., Knight, B., Liversedge, N., ... Winlove, C. P. (2013). The mechanical properties of human adipose tissues and their relationships to the structure and composition of the extracellular matrix. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305(12), E1427–35. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00111.2013>
- Allamand, V., Briñas, L., Richard, P., Stojkovic, T., Quijano-Roy, S., & Bonne, G. (2011). ColVI myopathies: where do we stand, where do we go? *Skeletal Muscle*, 1(1), 30. <http://doi.org/10.1186/2044-5040-1-30>
- ALVIM, R. O., CHEUHEN, M. R., MACHADO, S. R., SOUSA, A. G. P., SANTOS, P. C. J. L., ALVIM, R. O., ... SANTOS, P. C. J. L. (2015). General aspects of muscle glucose uptake. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 87(1), 351–368. <http://doi.org/10.1590/0001-3765201520140225>
- Angelin, A., Tiepolo, T., Sabatelli, P., Grumati, P., Bergamin, N., Golfieri, C., ... Bernardi, P. (2007). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 991–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0610270104>
- Arlachov, Y., & Ganatra, R. H. (2012). Sedation/anaesthesia in paediatric radiology. *The British Journal of Radiology*, 85(1019), e1018–31. <http://doi.org/10.1259/bjr/28871143>
- Asayama, K., Hayashibe, H., Dobashi, K., Uchida, N., Nakane, T., Kodera, K., ... Taniyama, M.

## BIBLIOGRAFÍA

- (2003). Decrease in serum adiponectin level due to obesity and visceral fat accumulation in children. *Obesity Research*, *11*(9), 1072–9. <http://doi.org/10.1038/oby.2003.147>
- Barban, S., & Schulze, H. O. (1961). The Effects of 2-Deoxyglucose on the Growth and Metabolism of Cultured Human Cells\* Preparation of Cell-free Extracts-Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol, *236*(7).
- Baumgartner, R. N. (2000). Body composition in healthy aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *904*, 437–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10865787>
- Benard, G., & Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxidants & Redox Signaling*, *10*(8), 1313–42. <http://doi.org/10.1089/ars.2007.2000>
- Berking, C., Takemoto, R., Schaidler, H., Showe, L., Satyamoorthy, K., Robbins, P., & Herlyn, M. (2001). Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Research*, *61*(22), 8306–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719464>
- Bernardi, P., & Bonaldo, P. (2008). Dysfunction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the pathogenesis of collagen VI muscular dystrophies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1147*, 303–11. <http://doi.org/10.1196/annals.1427.009>
- Berria, R., Wang, L., Richardson, D. K., Finlayson, J., Belfort, R., Pratipanawatr, T., ... Mandarino, L. J. (2006). Increased collagen content in insulin-resistant skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00202.2005>
- Blake, G. M., & Fogelman, I. (1997). Technical principles of dual energy x-ray absorptiometry. *Seminars in Nuclear Medicine*, *27*(3), 210–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224663>
- Bolduc, V., Zou, Y., Ko, D., & Bönnemann, C. G. (2014). siRNA-mediated Allele-specific Silencing of a COL6A3 Mutation in a Cellular Model of Dominant Ullrich Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *3*(2), e147. <http://doi.org/10.1038/mtna.2013.74>
- Bonaldo, P., Russo, V., Bucciotti, F., Doliana, R., & Colombatti, A. (1990). Structural and functional features of the alpha 3 chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry*, *29*(5), 1245–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2322559>

- Bönnemann, C. G. (2011). The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. *Nature Reviews. Neurology*, 7(7), 379–90. <http://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.81>
- Bönnemann, C. G., Wang, C. H., Quijano-Roy, S., Deconinck, N., Bertini, E., Ferreiro, A., ... North, K. N. (2014). Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 24(4), 289–311. <http://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.12.011>
- Bönnemann, C. G., Wang, C. H., Quijano-Roy, S., Deconinck, N., Bertini, E., Ferreiro, A., ... North, K. N. (2014). Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 24(4), 289–311. <http://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.12.011>
- Bouskila, M., Hirshman, M. F., Jensen, J., Goodyear, L. J., & Sakamoto, K. (2008). Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle, 28–35. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00481.2007>.
- Briñas, L., Richard, P., Quijano-Roy, S., Gartioux, C., Ledeuil, C., Lacène, E., ... Allamand, V. (2010). Early onset collagen VI myopathies: Genetic and clinical correlations. *Annals of Neurology*, 68(4), 511–20. <http://doi.org/10.1002/ana.22087>
- Briot, K. (2013). DXA parameters: Beyond bone mineral density. *Joint Bone Spine*, 80(3), 265–269. <http://doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.09.025>
- Buckner, J. L., Bowden, S. A., & Mahan, J. D. (2015). Optimizing Bone Health in Duchenne Muscular Dystrophy. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 928385. <http://doi.org/10.1155/2015/928385>
- Bushby, K. M. D., Collins, J., & Hicks, D. (2014). Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases, 802. <http://doi.org/10.1007/978-94-007-7893-1>
- Caselli, C. (2014). Role of adiponectin system in insulin resistance. *Molecular Genetics and Metabolism*. <http://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.09.003>
- Chen, P., Cescon, M., & Bonaldo, P. (2013). Collagen VI in cancer and its biological mechanisms. *Trends in Molecular Medicine*, 19(7), 410–7. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.001>
- Chen, Z.-P., Stephens, T. J., Murthy, S., Canny, B. J., Hargreaves, M., Witters, L. A., ... McConell, G. K. (2003). Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes*, 52(9), 2205–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941758>
- Cheng, J. S., Dubal, D. B., Kim, D. H., Legleiter, J., Cheng, I. H., Yu, G.-Q., ... Mucke, L. (2009).

## BIBLIOGRAFÍA

- Collagen VI protects neurons against Abeta toxicity. *Nature Neuroscience*, 12(2), 119–21.  
<http://doi.org/10.1038/nn.2240>
- Choi, Y. J. (2016). Dual-Energy X-Ray Absorptiometry: Beyond Bone Mineral Density Determination. *Endocrinology and Metabolism (Seoul, Korea)*, 31(1), 25–30.  
<http://doi.org/10.3803/EnM.2016.31.1.25>
- Chrisam, M., Pirozzi, M., Castagnaro, S., Blaauw, B., Polishchuck, R., Cecconi, F., ... Bonaldo, P. (2015). Reactivation of autophagy by spermidine ameliorates the myopathic defects of collagen VI-null mice, 11(12), 2142–2152.
- Ciaraldi, T. P., Mudaliar, S., Barzin, A., Macievic, J. A., Edelman, S. V., Park, K. S., & Henry, R. R. (2015). Skeletal Muscle GLUT1 Transporter Protein Expression and Basal Leg Glucose Uptake Are Reduced in Type 2 Diabetes. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-0516>, 90(June), 352–358. <http://doi.org/10.1210/jc.2004-0516>
- Clement, E. M., Feng, L., Mein, R., Sewry, C. a, Robb, S. a, Manzur, a Y., ... Muntoni, F. (2012). Relative frequency of congenital muscular dystrophy subtypes: analysis of the UK diagnostic service 2001-2008. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 22(6), 522–7.  
<http://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.01.010>
- Colombatti, A., Mucignat, M. T., & Bonaldo, P. (1995). Secretion and matrix assembly of recombinant type VI collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13105–11.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7768905>
- Coughlan, K. A., Valentine, R. J., Ruderman, N. B., & Saha, A. K. (2014). AMPK activation: A therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. <http://doi.org/10.2147/DMSO.S43731>
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378(6559), 785–9. <http://doi.org/10.1038/378785a0>
- Deconinck, N., Dion, E., Ben Yaou, R., Ferreiro, A., Eymard, B., Briñas, L., ... Stojkovic, T. (2010). Differentiating Emery-Dreifuss muscular dystrophy and collagen VI-related myopathies using a specific CT scanner pattern. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 20(8), 517–23.  
<http://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.04.009>
- Deconinck, N., Richard, P., Allamand, V., Behin, a, Lafôret, P., Ferreiro, a, ... Stojkovic, T. (2014a). Bethlem myopathy: long-term follow-up identifies COL6 mutations predicting severe clinical evolution. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 1–10.

- <http://doi.org/10.1136/jnnp-2013-307245>
- Deconinck, N., Richard, P., Allamand, V., Behin, a, Lafôret, P., Ferreiro, a, ... Stojkovic, T. (2014b). Bethlem myopathy: long-term follow-up identifies COL6 mutations predicting severe clinical evolution. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 1–10. <http://doi.org/10.1136/jnnp-2013-307245>
- Díaz-Manera, J., Llauger, J., Gallardo, E., & Illa, I. (2015). Muscle MRI in muscular dystrophies. *Acta Myologica : Myopathies and Cardiomyopathies : Official Journal of the Mediterranean Society of Myology / Edited by the Gaetano Conte Academy for the Study of Striated Muscle Diseases*, 34(2-3), 95–108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27199536>
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93, S52–S59. [http://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70014-6](http://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70014-6)
- Divakaruni, A. S., Brand, M. D., Adams, A., Hanrahan, O., Nolan, D., Voorheis, H., ... Lowell, B. (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 26(3), 192–205. <http://doi.org/10.1152/physiol.00046.2010>
- Donkervoort, S., Hu, Y., Stojkovic, T., Voermans, N. C., Foley, A. R., Leach, M. E., ... Bönnemann, C. G. (2015). Mosaicism for dominant collagen 6 mutations as a cause for intrafamilial phenotypic variability. *Human Mutation*, 36(1), 48–56. <http://doi.org/10.1002/humu.22691>
- Eiser, C., & Morse, R. (2001). Quality-of-life measures in chronic diseases of childhood. *Health Technology Assessment (Winchester, England)*, 5(4), 1–157. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11262421>
- Elias, C. F. (2012). Leptin action in pubertal development: recent advances and unanswered questions. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 23(1), 9–15. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2011.09.002>
- Engel, J., Furthmayr, H., Odermatt, E., von der Mark, H., Aumailley, M., Fleischmajer, R., & Timpl, R. (1985). Structure and macromolecular organization of type VI collagen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 460, 25–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3938630>
- Etienne, W., Meyer, M. H., Peppers, J., & Meyer, R. A. (2004). Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. *BioTechniques*, 36(4), 618–20, 622, 624–6.

## BIBLIOGRAFÍA

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15088380>

- Falorni, A., Bini, V., Molinari, D., Papi, F., Celi, F., Stefano, G. Di, ... Contessa, G. (1997). Leptin serum levels in normal weight and obese children and adolescents : relationship with age , sex , pubertal development , body mass index and insulin.
- Falzarano, M. S., Scotton, C., Passarelli, C., & Ferlini, A. (2015). Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(10), 18168–84. <http://doi.org/10.3390/molecules201018168>
- Faralli, H., Dilworth, F. J., Faralli, H., & Dilworth, F. J. (2012). Turning on Myogenin in Muscle: A Paradigm for Understanding Mechanisms of Tissue-Specific Gene Expression. *Comparative and Functional Genomics*, *2012*, 1–10. <http://doi.org/10.1155/2012/836374>
- Finnis, M. L., & Gibson, M. A. (1997). Microfibril-associated Glycoprotein-1 (MAGP-1) Binds to the Pepsin-resistant Domain of the 3(VI) Chain of Type VI Collagen. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(36), 22817–22823. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.36.22817>
- Fischer-Posovszky, P., Newell, F. S., Wabitsch, M., & Tornqvist, H. E. (2008). Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology. *Obesity Facts*, *1*(4), 184–9. <http://doi.org/10.1159/000145784>
- Foley, A. R., Hu, Y., Zou, Y., Yang, M., Medne, L., Leach, M., ... Bönnemann, C. G. (2011). Large genomic deletions: a novel cause of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, *69*(1), 206–11. <http://doi.org/10.1002/ana.22283>
- Foley, A. R., Quijano-Roy, S., Collins, J., Straub, V., McCallum, M., Deconinck, N., ... Bönnemann, C. G. (2013). Natural history of pulmonary function in collagen VI-related myopathies. *Brain*, *136*, 3625–3633. <http://doi.org/10.1093/brain/awt284>
- Freedman, D. S., Wang, J., Maynard, L. M., Thornton, J. C., Mei, Z., Pierson, R. N., ... Horlick, M. (2005). Relation of BMI to fat and fat-free mass among children and adolescents. *International Journal of Obesity (2005)*, *29*(1), 1–8. <http://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802735>
- Fryer, L. G. D., Parbu-Patel, A., & Carling, D. (2002). The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(28), 25226–32. <http://doi.org/10.1074/jbc.M202489200>
- Gara, S. K., Grumati, P., Urciuolo, A., Bonaldo, P., Kobbe, B., Koch, M., ... Wagener, R. (2008). Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(16), 10658–70. <http://doi.org/10.1074/jbc.M709540200>

- Gaster, M., Handberg, A., Beck-Nielsen, H., & Schroder, H. D. (2000). Glucose transporter expression in human skeletal muscle fibers. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 279(3), E529–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10950819>
- Gnaiger, E. (2012). [www.orooboros.at](http://www.orooboros.at) Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis. *Mitochondr Physiol Network OROBOROS MiPNet Publications*, 1718.
- Gómez-Campos, R., David Langer, R., de Fátima Guimarães, R., Contiero San Martini, M., Cossio-Bolaños, M., de Arruda, M., ... Moreira Gonçalves, E. (2016). Accuracy of Body Mass Index Cutoffs for Classifying Obesity in Chilean Children and Adolescents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(5). <http://doi.org/10.3390/ijerph13050472>
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5684), 626–9. <http://doi.org/10.1126/science.1099320>
- Green, H., & Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5(1), 19–27. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90087-2](http://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90087-2)
- Grumati, P., Coletto, L., Sabatelli, P., Cescon, M., Angelin, A., Bertaggia, E., ... Bonaldo, P. (2010). Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nature Medicine*, 16(11), 1313–20. <http://doi.org/10.1038/nm.2247>
- Gualandi, F., Curci, R., Sabatelli, P., Martoni, E., Bovolenta, M., Maraldi, M. N., ... Ferlini, A. A. (2011). Macrophages: a minimally invasive tool for monitoring collagen VI myopathies. *Muscle & Nerve*, 44(1), 80–4. <http://doi.org/10.1002/mus.21999>
- Hathout, Y., Marathi, R. L., Rayavarapu, S., Zhang, A., Brown, K. J., Seol, H., ... McDonald, C. (n.d.). Discovery of serum protein biomarkers in the mdx mouse model and cross-species comparison to Duchenne muscular dystrophy patients. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddu366>
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., ... Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*, 2(1), 9–19. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009>

## BIBLIOGRAFÍA

- Hay, N. (2011, November). Interplay between FOXO, TOR, and Akt. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. NIH Public Access. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.013>
- Heino, J. (2007). The collagen family members as cell adhesion proteins. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 29(10), 1001–10. <http://doi.org/10.1002/bies.20636>
- Helba, M., & Binkovitz, L. A. (2009). Pediatric body composition analysis with dual-energy X-ray absorptiometry. *Pediatric Radiology*, 39(7), 647–56. <http://doi.org/10.1007/s00247-009-1247-0>
- Henegar, C., Tordjman, J., Achard, V., Lacasa, D., Cremer, I., Guerre-Millo, M., ... Clement, K. (2008). Open Access Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity Background. *Article R14 Genome Biology Genome Biology*, 9(1). <http://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r14>
- Hicks, D., Farsani, G. T., Laval, S., Collins, J., Sarkozy, A., Martoni, E., ... Straub, V. (2014). Mutations in the collagen XII gene define a new form of extracellular matrix-related myopathy. *Human Molecular Genetics*, 23(9), 2353–63. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt637>
- Howlett, K. F., Sakamoto, K., Garnham, A., Cameron-Smith, D., & Hargreaves, M. (2007). Resistance exercise and insulin regulate AS160 and interaction with 14-3-3 in human skeletal muscle. *Diabetes*, 56(6), 1608–14. <http://doi.org/10.2337/db06-1398>
- Huang, G., Ge, G., Wang, D., Gopalakrishnan, B., Butz, D. H., Colman, R. J., ... Greenspan, D. S. (2011).  $\alpha 3$  (V) Collagen is critical for glucose homeostasis in mice due to effects in pancreatic islets and peripheral tissues, 121(2), 769–783. <http://doi.org/10.1172/JCI45096DS1>
- Hutter, E., Renner, K., Pfister, G., Ockl, P. S., Jansen-Urr, P., & Gnaiger, E. (2004). Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem. J*, 380, 919–928.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297042>
- Inokuchi, M., Matsuo, N., Takayama, J. I., & Hasegawa, T. (2011). BMI z-score is the optimal measure of annual adiposity change in elementary school children. *Annals of Human Biology*, 38(6), 747–51. <http://doi.org/10.3109/03014460.2011.620625>

- Institute of Medicine (US) Committee on Accelerating Rare Diseases Research and Orphan Product Development. (2010). Profile of Rare Diseases. In *Rare Diseases and Orphan Products: Accelerating Research and Development*. National Academies Press (US). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56184/>
- Irwin, W. a, Bergamin, N., Sabatelli, P., Reggiani, C., Megighian, A., Merlini, L., ... Bonaldo, P. (2003). Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nature Genetics*, *35*(4), 367–71. <http://doi.org/10.1038/ng1270>
- Ishiki, M., & Klip, A. (2005). Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology*, *146*(12), 5071–8. <http://doi.org/10.1210/en.2005-0850>
- Iyengar, P., Combs, T. P., Shah, S. J., Gouon-Evans, V., Pollard, J. W., Albanese, C., ... Scherer, P. E. (2003). Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene*, *22*, 6408–6423. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1206737>
- Iyengar, P., Espina, V., Williams, T. W., Lin, Y., Berry, D., Jelicks, L. A., ... Scherer, P. E. (2005). Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo , demonstrating a critical interaction in the tumor / stroma microenvironment, *115*(5), 1163–1176. <http://doi.org/10.1172/JCI200523424>.The
- Jessen, N., An, D., Lihn, A. S., Nygren, J., Hirshman, M. F., Thorell, A., & Goodyear, L. J. (2011). Exercise increases TBC1D1 phosphorylation in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *301*(1), E164–71. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00042.2011>
- Jimenez-Mallebrera, C., Brown, S. C., Sewry, C. a, & Muntoni, F. (2005). Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *62*(7-8), 809–23. <http://doi.org/10.1007/s00018-004-4510-4>
- Jimenez-Mallebrera, C., Maioli, M. a, Kim, J., Brown, S. C., Feng, L., Lampe, a K., ... Muntoni, F. (2006). A comparative analysis of collagen VI production in muscle, skin and fibroblasts from 14 Ullrich congenital muscular dystrophy patients with dominant and recessive COL6A mutations. *Neuromuscular Disorders : NMD*, *16*(9-10), 571–82. <http://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.07.015>
- Jöbsis, G. J., Keizers, H., Vreijling, J. P., de Visser, M., Speer, M. C., Wolterman, R. A., ... Bolhuis, P. A. (1996). Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant

## BIBLIOGRAFÍA

- myopathy with contractures. *Nature Genetics*, 14(1), 113–5. <http://doi.org/10.1038/ng0996-113>
- Kakinami, L., Henderson, M., Chiolero, A., Cole, T. J., & Paradis, G. (2014). Identifying the best body mass index metric to assess adiposity change in children. *Archives of Disease in Childhood*, 99(11), 1020–4. <http://doi.org/10.1136/archdischild-2013-305163>
- Kane, S., Sano, H., Liu, S. C. H., Asara, J. M., Lane, W. S., Garner, C. C., & Lienhard, G. E. (2002). A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22115–8. <http://doi.org/10.1074/jbc.C200198200>
- Karlsson, H. K. R., Zierath, J. R., Kane, S., Krook, A., Lienhard, G. E., & Wallberg-Henriksson, H. (2005). Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, 54(6), 1692–7. <http://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1692>
- Kawahara, G., Ogawa, M., Okada, M., Malicdan, M. C. V., Goto, Y. I., Hayashi, Y. K., ... Nishino, I. (2008). Diminished binding of mutated collagen VI to the extracellular matrix surrounding myocytes. *Muscle and Nerve*, 38(3), 1192–1195. <http://doi.org/10.1002/mus.21030>
- Kawahara, G., Okada, M., Morone, N., Ibarra, C. A., Nonaka, I., Noguchi, S., ... Nishino, I. (2007). Reduced cell anchorage may cause sarcolemma-specific collagen VI deficiency in Ullrich disease. *Neurology*, 69(10), 1043–1049. <http://doi.org/10.1212/01.wnl.0000271386.89878.22>
- Kelley, D. E., Reilly, J. P., Veneman, T., & Mandarino, L. J. (1990). Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans. *The American Journal of Physiology*, 258(6 Pt 1), E923–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2113769>
- Kern, P. A., Di Gregorio, G. B., Lu, T., Rassouli, N., & Ranganathan, G. (n.d.). Adiponectin Expression From Human Adipose Tissue Relation to Obesity, Insulin Resistance, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Expression.
- Khan, T., Muise, E. S., Iyengar, P., Wang, Z. V., Chandalia, M., Abate, N., ... Scherer, P. E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Molecular and Cellular Biology*, 29, 1575–1591. <http://doi.org/10.1128/MCB.01300-08>
- Kim, J. B. (2016). Dynamic cross talk between metabolic organs in obesity and metabolic diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(3), e214.

- <http://doi.org/10.1038/emm.2015.119>
- Kim, J., Jimenez-Mallebrera, C., Foley, a R., Fernandez-Fuente, M., Brown, S. C., Torelli, S., ... Muntoni, F. (2012). Flow cytometry analysis: a quantitative method for collagen VI deficiency screening. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 22(2), 139–48. <http://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.08.006>
- Koester-Weber, T., Valtueña, J., Breidenassel, C., Beghin, L., Plada, M., Moreno, S., ... Gonzalez-Gross, M. (2014). Reference values for leptin, cortisol, insulin and glucose, among European adolescents and their association with adiposity: the HELENA study. *Nutrición Hospitalaria*, 30(5), 1181–90. <http://doi.org/10.3305/nh.2014.30.5.7982>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99–163. <http://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Kuo, H. J., Maslen, C. L., Keene, D. R., & Glanville, R. W. (1997). Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26522–26529. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26522>
- Lamandé, S. R., Mörgelin, M., Selan, C., Jöbsis, G. J., Baas, F., & Bateman, J. F. (2002). Kinked collagen VI tetramers and reduced microfibril formation as a result of Bethlem myopathy and introduced triple helical glycine mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(3), 1949–56. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109932200>
- Lampe, a K., & Bushby, K. M. D. (2005). Collagen VI related muscle disorders. *Journal of Medical Genetics*, 42(9), 673–85. <http://doi.org/10.1136/jmg.2002.002311>
- Lampe, A. K., Dunn, D. M., von Niederhausern, A. C., Hamil, C., Aoyagi, A., Laval, S. H., ... Weiss, R. B. (2005). Automated genomic sequence analysis of the three collagen VI genes: applications to Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Journal of Medical Genetics*, 42(2), 108–20. <http://doi.org/10.1136/jmg.2004.023754>
- Lampe, A. K., Zou, Y., Sudano, D., O'Brien, K. K., Hicks, D., Laval, S. H., ... Bönnemann, C. G. (2008). Exon skipping mutations in collagen VI are common and are predictive for severity and inheritance. *Human Mutation*, 29(6), 809–22. <http://doi.org/10.1002/humu.20704>
- Landfeldt, E., Lindgren, P., Bell, C. F., Guglieri, M., Straub, V., Lochmüller, H., & Bushby, K. (2016). Health-related quality of life in patients with Duchenne muscular dystrophy: a multinational, cross-sectional study. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 58(5), 508–15. <http://doi.org/10.1111/dmnc.12938>
- Leitinger, B., & Hohenester, E. (2007, April). Mammalian collagen receptors. *Matrix Biology*.

## BIBLIOGRAFÍA

- <http://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.007>
- Liu, J., Burkin, D. J., & Kaufman, S. J. (2008). Increasing alpha 7 beta 1-integrin promotes muscle cell proliferation, adhesion, and resistance to apoptosis without changing gene expression. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 294(2), C627–40. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00329.2007>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007, June 29). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Marshall, B. A., Ren, J. M., Johnson, D. W., Gibbs, E. M., Lillquist, J. S., Soeller, W. C., ... Mueckler, M. (1993). Germline manipulation of glucose homeostasis via alteration of glucose transporter levels in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18442–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8360145>
- Martos-Moreno, G. A., Kopchick, J. J., & Argente, J. (2013). [Adipokines in healthy and obese children]. *Anales de Pediatría (Barcelona, Spain : 2003)*, 78(3), 189.e1–189.e15. <http://doi.org/10.1016/j.anpedi.2012.10.008>
- Mayer, U. (2003). Integrins: Redundant or Important Players in Skeletal Muscle? *Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 14587–14590. <http://doi.org/10.1074/jbc.R200022200>
- McCulloch, L. J., Rawling, T. J., Sjöholm, K., Franck, N., Dankel, S. N., Price, E. J., ... Kos, K. (2015). COL6A3 is regulated by leptin in human adipose tissue and reduced in obesity. *Endocrinology*, 156(1), 134–146. <http://doi.org/10.1210/en.2014-1042>
- McCulloch, L. J., Rawling, T. J., Sjöholm, K., Franck, N., Nitter, S. E., Price, E. J., ... Kos, K. (2014). COL6A3 is regulated by leptin in human adipose tissue and reduced in obesity. *Endocrinology*, (October), en20141042. <http://doi.org/10.1210/en.2014-1042>
- Meilleur, K. G., Jain, M. S., Hynan, L. S., Shieh, C.-Y., Kim, E., Waite, M., ... Bönnemann, C. G. (2014). Results of a two-year pilot study of clinical outcome measures in collagen VI-related myopathy and LAMA2-related muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders : NMD*. <http://doi.org/10.1016/j.nmd.2014.09.010>
- Mercier, S., Toutain, A., Toussaint, A., Raynaud, M., de Barace, C., Marcorelles, P., ... Desguerre, I. (2013). Genetic and clinical specificity of 26 symptomatic carriers for dystrophinopathies at pediatric age. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 21(8), 855–63. <http://doi.org/10.1038/ejhg.2012.269>
- Mercuri, E., Lampe, A., Allsop, J., Knight, R., Pane, M., Kinali, M., ... Muntoni, F. (2005). Muscle MRI in Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Neuromuscular*

- Disorders : NMD, 15(4), 303–10.* <http://doi.org/10.1016/j.nmd.2005.01.004>
- Mercuri, E., Yuva, Y., Brown, S. C., Brockington, M., Kinali, M., Jungbluth, H., ... Muntoni, F. (2002). Collagen VI involvement in Ullrich syndrome: a clinical, genetic, and immunohistochemical study. *Neurology, 58(9), 1354–9.* Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011280>
- Merlini, L., Angelin, A., Tiepolo, T., Braghetta, P., Sabatelli, P., Zamparelli, A., ... Bernardi, P. (2008). Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI myopathies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(13), 5225–5229.* <http://doi.org/10.1073/pnas.0800962105>
- Merlini, L., Martoni, E., Grumati, P., Sabatelli, P., Squarzoni, S., Urciuolo, A., ... Bonaldo, P. (2008). Autosomal recessive myosclerosis myopathy is a collagen VI disorder. *Neurology, 71(16), 1245–53.* <http://doi.org/10.1212/01.wnl.0000327611.01687.5e>
- Minamitani, T., Ariga, H., & Matsumoto, K. (2004). Deficiency of tenascin-X causes a decrease in the level of expression of type VI collagen. *Experimental Cell Research, 297(1), 49–60.* <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.002>
- Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O. D., Fryer, L. G. D., Müller, C., Carling, D., & Kahn, B. B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature, 415(6869), 339–43.* <http://doi.org/10.1038/415339a>
- Miscione, M. T., Bruno, F., Ripamonti, C., Nervuti, G., Orsini, R., Faldini, C., ... Merlini, L. (2013). Body Composition , Muscle Strength , and Physical Function of Patients with Bethlem Myopathy and Ullrich Congenital Muscular Dystrophy, 2013.
- Mohan, P. S., Carter, W. G., & Spiro, R. G. (1990). Occurrence of type VI collagen in extracellular matrix of renal glomeruli and its increase in diabetes. *Diabetes, 39(1), 31–7.* Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2210058>
- Mohire, M. D., Tandan, R., Fries, T. J., Little, B. W., Pendlebury, W. W., & Bradley, W. G. (1988). Early-onset benign autosomal dominant limb-girdle myopathy with contractures (Bethlem myopathy). *Neurology, 38(4), 573–80.* Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3352914>
- Momcilovic, M., Hong, S.-P., & Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *The Journal of Biological Chemistry, 281(35), 25336–43.* <http://doi.org/10.1074/jbc.M604399200>
- Moreira, H., Carona, C., Silva, N., Frontini, R., Bullinger, M., Canavaro, M. C., ... Mackey, E. R.

## BIBLIOGRAFÍA

- (2013). Psychological and quality of life outcomes in pediatric populations: a parent-child perspective. *The Journal of Pediatrics*, 163(5), 1471–8. <http://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.06.028>
- Morey, J. S., Ryan, J. C., & Van Dolah, F. M. (2006). Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures Online*, 8, 175–93. <http://doi.org/10.1251/bpo126>
- Motrescu, E. R., Blaise, S., Etique, N., Messaddeq, N., Chenard, M.-P., Stoll, I., ... Rio, M.-C. (2008). Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene*, 27(49), 6347–55. <http://doi.org/10.1038/onc.2008.218>
- Muntoni, F., & Voit, T. (2004). The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 14(10), 635–49. <http://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.06.009>
- Muona, P., Jaakkola, S., Zhang, R. Z., Pan, T. C., Pelliniemi, L., Risteli, L., ... Peltonen, J. (1993). Hyperglycemic glucose concentrations up-regulate the expression of type VI collagen in vitro. Relevance to alterations of peripheral nerves in diabetes mellitus. *The American Journal of Pathology*, 142(5), 1586–97. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1886917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Nadeau, A., Aloysius, A., & Clement, E. (2009). Natural history of Ullrich congenital muscular dystrophy, 25–31.
- Nakajima, I., Muroya, S., Tanabe, R., & Chikuni, K. (2002). Extracellular matrix development during differentiation into adipocytes with a unique increase in type V and VI collagen, 94, 197–203.
- Norwood, F. L. M., Harling, C., Chinnery, P. F., Eagle, M., Bushby, K., & Straub, V. (2009). Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain : A Journal of Neurology*, 132(Pt 11), 3175–86. <http://doi.org/10.1093/brain/awp236>
- O'Grady, G. L., Lek, M., Lamande, S. R., Waddell, L., Oates, E. C., Punetha, J., ... North, K. (2016). Diagnosis and aetiology of congenital muscular dystrophy: we are halfway there. *Annals of Neurology*. <http://doi.org/10.1002/ana.24687>
- O'Neill, H. M. (2013). AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity. *Diabetes &*

- Metabolism Journal*, 37(1), 1–21. <http://doi.org/10.4093/dmj.2013.37.1.1>
- Oakhill, J. S., Steel, R., Chen, Z.-P., Scott, J. W., Ling, N., Tam, S., & Kemp, B. E. (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6036), 1433–5. <http://doi.org/10.1126/science.1200094>
- Paco, S., Casserras, T., Rodríguez, M. A., Jou, C., Puigdelloses, M., Ortez, C. I., ... Jimenez-Mallebrera, C. (2015). Transcriptome Analysis of Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts Reveals a Disease Extracellular Matrix Signature and Key Molecular Regulators. *PloS One*, 10(12), e0145107. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0145107>
- Paco, S., Ferrer, I., Jou, C., Cusí, V., Corbera, J., Torner, F., ... Jimenez-Mallebrera, C. (2012a). Muscle Fiber Atrophy and Regeneration Coexist in Collagen VI–Deficient Human Muscle. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. <http://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31826c6f7b>
- Paco, S., Ferrer, I., Jou, C., Cusí, V., Corbera, J., Torner, F., ... Jimenez-Mallebrera, C. (2012b). Muscle Fiber Atrophy and Regeneration Coexist in Collagen VI–Deficient Human Muscle. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 71(10), 894–906. <http://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31826c6f7b>
- Paco, S., Kalko, S. G., Jou, C., Rodríguez, M. a, Corbera, J., Muntoni, F., ... Jimenez-Mallebrera, C. (2013). Gene expression profiling identifies molecular pathways associated with collagen VI deficiency and provides novel therapeutic targets. *PloS One*, 8(10), e77430. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077430>
- Palm, D. C., Rohwer, J. M., & Hofmeyr, J.-H. S. (2013). Regulation of glycogen synthase from mammalian skeletal muscle - a unifying view of allosteric and covalent regulation. *FEBS Journal*, 280(1), 2–27. <http://doi.org/10.1111/febs.12059>
- Pandav, G., Saxena, D., Kaur, H., Jain, S., & Dewan, A. (2014). Collagen: Basis of Life. *Universal Research Journal of Dentistry*, 4(1), 1. <http://doi.org/10.4103/2249-9725.127046>
- Pang, G., Xie, J., Chen, Q., & Hu, Z. (2014). Energy intake, metabolic homeostasis, and human health. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 89–103. <http://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.01.001>
- Park, J., & Scherer, P. E. (2012). Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 4243–56. <http://doi.org/10.1172/JCI63930>
- Pasarica, M., Gowronska-Kozak, B., Burk, D., Remedios, I., Hymel, D., Gimble, J., ... Smith, S. R.

## BIBLIOGRAFÍA

- (2009). Adipose tissue collagen VI in obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(12), 5155–5162. <http://doi.org/10.1210/jc.2009-0947>
- Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J. T., Leung, D., ... Dedhar, S. (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 27462–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M102940200>
- Phillips, D. I., Caddy, S., Ilic, V., Fielding, B. A., Frayn, K. N., Borthwick, A. C., & Taylor, R. (1996). Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 45(8), 947–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8769349>
- Pruna, L., Chatelin, J., Pascal-Vigneron, V., & Kaminsky, P. (2011). Regional body composition and functional impairment in patients with myotonic dystrophy. *Muscle & Nerve*, 44(4), 503–8. <http://doi.org/10.1002/mus.22099>
- Robinson, R., Robinson, L. J., James, D. E., & Lawrence, J. C. (1993). Glucose transport in L6 myoblasts overexpressing GLUT1 and GLUT4. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(29), 22119–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8408071>
- Ronti, T., Lupattelli, G., & Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinology*, 64(4), 355–65. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02474.x>
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444(7121), 847–853. <http://doi.org/10.1038/nature05483>
- Rühl, M., Johannsen, M., Atkinson, J., Manski, D., Sahin, E., Somasundaram, R., ... Schuppan, D. (1999). Soluble collagen VI induces tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase and activates the MAP kinase erk2 in fibroblasts. *Exp Cell Res*, 250(2), 548–557. <http://doi.org/10.1006/excr.1999.4540>
- Rühl, M., Sahin, E., Johannsen, M., Somasundaram, R., Manski, D., Riecken, E. O., & Schuppan, D. (1999). Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34361–34368. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.48.34361>
- Sabatelli, P., Bonaldo, P., Lattanzi, G., Braghetta, P., Bergamin, N., Capanni, C., ... Squarzoni, S. (2001). Collagen VI deficiency affects the organization of fibronectin in the extracellular matrix of cultured fibroblasts. *Matrix Biology*, 20(7), 475–486.

[http://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00160-3](http://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00160-3)

- Sabatelli, P., Gara, S. K., Grumati, P., Urciuolo, A., Gualandi, F., Curci, R., ... Wagener, R. (2011). Expression of the collagen VI  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  chains in normal human skin and in skin of patients with collagen VI-related myopathies. *The Journal of Investigative Dermatology*, *131*(1), 99–107. <http://doi.org/10.1038/jid.2010.284>
- Sakamoto, K., & Holman, G. D. (2008). Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *295*(1), E29–37. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.90331.2008>
- Sakamoto, K., McCarthy, A., Smith, D., Green, K. A., Grahame Hardie, D., Ashworth, A., & Alessi, D. R. (2005). Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *The EMBO Journal*, *24*(10), 1810–20. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600667>
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, *414*(6865), 799–806. <http://doi.org/10.1038/414799a>
- Samardzic, M., Tahirovic, H., Popovic, N., & Popovic-Samardzic, M. (2016). Health-related quality of life in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus from Montenegro: relationship to metabolic control. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism : JPEM*, *29*(6), 663–8. <http://doi.org/10.1515/jpem-2015-0420>
- Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A., & Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *The Biochemical Journal*, *403*(1), 139–48. <http://doi.org/10.1042/BJ20061520>
- Sanes, J. R. (1982). Laminin, fibronectin, and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. *The Journal of Cell Biology*, *93*(2), 442–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7047538>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968>
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5712), 1098–101. <http://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Sasaki, T., Göhring, W., Pan, T. C., Chu, M. L., & Timpl, R. (1995). Binding of mouse and human fibulin-2 to extracellular matrix ligands. *Journal of Molecular Biology*, *254*(5), 892–9.

## BIBLIOGRAFÍA

- <http://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0664>
- Scherer, P. E., Bickel, P. E., Kotler, M., & Lodish, H. F. (1998). Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nature Biotechnology*, *16*(6), 581–6. <http://doi.org/10.1038/nbt0698-581>
- Schessl, J., Goemans, N. M., Magold, A. I., Zou, Y., Hu, Y., Kirschner, J., ... Bönnemann, C. G. (2008). Predominant fiber atrophy and fiber type disproportion in early ullrich disease. *Muscle & Nerve*, *38*(3), 1184–91. <http://doi.org/10.1002/mus.21088>
- Schnoor, M., Cullen, P., Lorkowski, J., Stolle, K., Robenek, H., Troyer, D., ... Lorkowski, S. (2008). Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *180*(8), 5707–19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390756>
- Seabolt, L. A., Welch, E. B., & Silver, H. J. (2015). Imaging methods for analyzing body composition in human obesity and cardiometabolic disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1353*(1), 41–59. <http://doi.org/10.1111/nyas.12842>
- Shehzad, A., Iqbal, W., Shehzad, O., & Lee, Y. S. (2012). Adiponectin: Regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones-International Journal of Endocrinology and Metabolism*, *11*(1), 8–20. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000302495100002
- Sherman, V. R., Yang, W., & Meyers, M. A. (2015). The materials science of collagen. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *52*, 22–50. <http://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.05.023>
- Sherman-Baust, C. A., Weeraratna, A. T., Rangel, L. B. A., Pizer, E. S., Cho, K. R., Schwartz, D. R., ... Morin, P. J. (2003). Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell*, *3*(4), 377–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12726863>
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., & Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(10), 5522–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10318916>
- Skalsky, A. J., Abresch, R. T., Han, J. J., Shin, C. S., & McDonald, C. M. (2008). The relationship between regional body composition and quantitative strength in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Neuromuscular Disorders*. <http://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.07.005>

- Smeriglio, P., Dhulipala, L., Lai, J. H., Goodman, S. B., Drago, J. L., Smith, R. L., ... Bhutani, N. (2015). Collagen VI Enhances Cartilage Tissue Generation by Stimulating Chondrocyte Proliferation. *Tissue Engineering Part A*, 21(3-4), 840–849. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0375>
- Spencer, M., Yao-Borengasser, A., Unal, R., Rasouli, N., Gurley, C. M., Zhu, B., ... Kern, P. A. (2010). Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299, 1016–1027. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00329.2010>
- Sproule, D. M., Montes, J., Montgomery, M., Battista, V., Koenigsberger, D., Shen, W., ... Kaufmann, P. (2009). Increased fat mass and high incidence of overweight despite low body mass index in patients with spinal muscular atrophy. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 19(6), 391–6. <http://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.03.009>
- Stuart, C. A., Yin, D., Howell, M. E. A., Dykes, R. J., Laffan, J. J., & Ferrando, A. A. (2006). Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 291(5), E1067–73. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00250.2006>
- Sun, K., Park, J., Gupta, O. T., Holland, W. L., Auerbach, P., Zhang, N., ... Scherer, P. E. (2014). ARTICLE Endotrophin triggers adipose tissue fibrosis and metabolic dysfunction. *Nature Communications*, 5. <http://doi.org/10.1038/ncomms4485>
- Sun, K., Tordjman, J., Clement, K., & Scherer, P. E. (2013). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metabolism*. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.016>
- Sutherland, C. (2011). What Are the bona fide GSK3 Substrates? *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 505607. <http://doi.org/10.4061/2011/505607>
- Tagliavini, F., Pellegrini, C., Sardone, F., Squarzoni, S., Paulsson, M., Wagener, R., ... Sabatelli, P. (2014). Defective collagen VI  $\alpha 6$  chain expression in the skeletal muscle of patients with collagen VI-related myopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(9), 1604–12. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.033>
- Taha, C., Liu, Z., Jin, J., Al-Hasani, H., Sonenberg, N., & Klip, A. (1999). Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 33085–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551878>

## BIBLIOGRAFÍA

- Telfer, W. R., Busta, A. S., Bonnemann, C. G., Feldman, E. L., & Dowling, J. J. (2010). Zebrafish models of collagen VI-related myopathies. *Human Molecular Genetics*, *19*(12), 2433–2444. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddq126>
- Theocharidis, G., Drymoussi, Z., Kao, A. P., Barber, A. H., Lee, D. A., Braun, K. M., & Connelly, J. T. (2016). Type VI Collagen Regulates Dermal Matrix Assembly and Fibroblast Motility. *The Journal of Investigative Dermatology*, *136*(1), 74–83. <http://doi.org/10.1038/JID.2015.352>
- Tillet, E., Genial, B., Garrone, R., & Stallcup, W. B. (2002). NG2 proteoglycan mediates beta1 integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. *Journal of Cellular Biochemistry*, *86*(4), 726–736. <http://doi.org/10.1002/jcb.10268>
- Toni, S., Morandi, R., Busacchi, M., Tardini, L., Merlini, L., Battistini, N. C., & Pellegrini, M. (2014). Nutritional status evaluation in patients affected by bethlem myopathy and ullrich congenital muscular dystrophy. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *6*(November), 315. <http://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00315>
- Tremblay, F., Lavigne, C., Jacques, H., & Marette, A. (2001). Defective Insulin-Induced GLUT4 Translocation in Skeletal Muscle of High Fat-Fed Rats Is Associated with Alterations in Both Akt/Protein Kinase B and Atypical Protein Kinase C ( $\zeta/\lambda$ ) Activities. *Diabetes*, *50*(8), 1901–1910. <http://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1901>
- Varni, J. W., Seid, M., & Rode, C. A. (1999). The PedsQL: measurement model for the pediatric quality of life inventory. *Medical Care*, *37*(2), 126–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10024117>
- Vuillerot, C., Braillon, P., Fontaine-Carbonnel, S., Rippert, P., André, E., Iwaz, J., ... Bérard, C. (2014). Influence of a two-year steroid treatment on body composition as measured by dual X-ray absorptiometry in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, *24*, 467–473. <http://doi.org/10.1016/j.nmd.2014.03.002>
- Wiberg, C., Hedbom, E., Khairullina, A., Lamandé, S. R., Oldberg, Å., Timpl, R., ... Heinegård, D. (2001). Biglycan and Decorin Bind Close to the N-terminal Region of the Collagen VI Triple Helix. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(22), 18947–18952. <http://doi.org/10.1074/jbc.M100625200>
- Wiberg, C., Klatt, A. R., Wagener, R., Paulsson, M., Bateman, J. F., Heinegård, D., & Morgelin, M. (2003). Complexes of Matrilin-1 and Biglycan or Decorin Connect Collagen VI Microfibrils to Both Collagen II and Aggrecan. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(39), 37698–37704. <http://doi.org/10.1074/jbc.M304638200>

- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–6, 478–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067025>
- Willis, T. A., Hollingsworth, K. G., Coombs, A., Sveen, M.-L., Andersen, S., Stojkovic, T., ... Straub, V. (2014). Quantitative magnetic resonance imaging in limb-girdle muscular dystrophy 2I: a multinational cross-sectional study. *PloS One*, 9(2), e90377. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0090377>
- Xu, L., Li, M., Yin, J., Cheng, H., Yu, M., Zhao, X., ... Mi, J. (2012). Change of Body Composition and Adipokines and Their Relationship with Insulin Resistance across Pubertal Development in Obese and Nonobese Chinese Children: The BCAMS Study. *International Journal of Endocrinology*, 2012, 389108. <http://doi.org/10.1155/2012/389108>
- Yadav, A., Kataria, M. A., Saini, V., & Yadav, A. (2013). Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica Chimica Acta*, 417, 80–84. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2012.12.007>
- Yonekawa, T., Komaki, H., Okada, M., Hayashi, Y. K., Nonaka, I., Sugai, K., ... Nishino, I. (2013). Rapidly progressive scoliosis and respiratory deterioration in Ullrich congenital muscular dystrophy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 84(9), 982–8. <http://doi.org/10.1136/jnnp-2012-304710>
- Yonekawa, T., & Nishino, I. (2015a). Ullrich congenital muscular dystrophy: clinicopathological features, natural history and pathomechanism(s). *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 86(3), 280–7. <http://doi.org/10.1136/jnnp-2013-307052>
- Yonekawa, T., & Nishino, I. (2015b). Ullrich congenital muscular dystrophy: clinicopathological features, natural history and pathomechanism(s). *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 86(3), 280–7. <http://doi.org/10.1136/jnnp-2013-307052>
- You, W.-K., Bonaldo, P., & Stallcup, W. B. (2012). Collagen VI ablation retards brain tumor progression due to deficits in assembly of the vascular basal lamina. *The American Journal of Pathology*, 180(3), 1145–58. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.11.006>
- Zhou, L., Deepa, S. S., Etzler, J. C., Ryu, J., Mao, X., Fang, Q., ... Dong, L. Q. (2009). Adiponectin activates AMP-activated protein kinase in muscle cells via APPL1/LKB1-dependent and phospholipase C/Ca<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-dependent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 22426–35. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.028357>
- Zhu, C.-H., Mouly, V., Cooper, R. N., Mamchaoui, K., Bigot, A., Shay, J. W., ... Wright, W. E. (2007).

## BIBLIOGRAFÍA

Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell*, 6(4), 515–23. <http://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00306.x>

Zou, Y., Zwolanek, D., Izu, Y., Gandhi, S., Schreiber, G., Brockmann, K., ... Bönnemann, C. G. (2014). Recessive and dominant mutations in COL12A1 cause a novel EDS/myopathy overlap syndrome in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, 23(9), 2339–52. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt627>





## **9 ANEXO**

---



**Tabla 2: Pacientes incluidos en esta tesis:** \*\* UCMD con fenotipo intermedio que caminan pero con una debilidad significativa lo que hace pensar que perderán la marcha alrededor de los 20 años o antes. Cuando no hay información disponible sobre uno de los signos clínicos se indica con “n.d.”. EESS hacer referencia a extremidades superiores y EEII, a extremidades inferiores.

ID	Fenotipo	Edad	Sexo	Edad inicio enfermedad	Síntoma de presentación
P1	UCMD	6	M	neonatal	tortícolis congénita
P2	UCMD**	12	F	neonatal	tortícolis congénita
P3	UCMD**	9	F	neonatal	hipotonía
P4	BM	39	F	n.d.	n.d.
P5	UCMD**	15	M	6 años	debilidad
P6	UCMD	10	M	neonatal	hipotonía
P7	UCMD	23	M	neonatal	hipotonía, debilidad, hiperlaxitud.
P8	UCMD	7	M	< 5 años	retraso desarrollo motor y aumento de creatina kinasa
P9	UCMD	5	M	neonatal	luxación congénita de cadera
P10	BM	19	F	3 años	debilidad
P11	UCMD	34	M	neonatal	hipotonía, debilidad, retraso desarrollo motor
P12	UCMD	17	M	neonatal	hipotonía, debilidad, hiperlaxitud
P13	UCMD**	17	M	neonatal	luxación congénita de cadera
P14	UCMD	2	M	neonatal	hipotonía y luxación congénita de caderas
P15	UCMD**	10	F	neonatal	luxación congénita de cadera
P16	UCMD**	18	F	neonatal	hipotonía
P17	UCMD	10	M	neonatal	hipotonía, hiperlaxitud
P18	UCMD	4	F	neonatal	hipotonía, tortícolis congénita
P19	UCMD	6	M	neonatal	hipotonía, artrogriposis congénita
P20	UCMD	11	M	neonatal	hipotonía, hiperlaxitud
P21	BM	42	M	4 años	caídas frecuentes
P22	BM	48	M	neonatal	hipotonía, debilidad
P23	BM	41	F	5 años	dificultad para andar, caídas frecuentes
P24	BM	42	M	9 años	dificultad para correr y saltar
P25	BM	43	F	1 año	retraso motor, torpeza
P26	BM	41	F	neonatal	movimientos fetales reducidos, retraso motor, caídas frecuentes
P27	BM	53	F	infancia	caídas frecuentes
P28	BM	36	F	neonatal	retraso motor, caídas frecuentes
P29	BM	24	F	neonatal	retraso motor
P30	BM	59	F	infancia	torpeza

Mutación	Ventilación asistida	Ambulación	Edad pérdida deambulacion
COL6A2: het c [(820 G>T)]; p [(Gly274Cys)]	no	Ambulante	no
COL6A1: het c.[(717+4 A>G)]; p [(Arg271*)]	no	Ambulante	no
no realizado	no	Ambulante	no
COL6A1: het c[(.877G>A); p [(Gly293Arg)]	no	Ambulante	no
COL6A1 c.1056+1 G>A; p.Gly335_Asp352del	no	Ambulante	no
COL6A1: het c[(.877G>A); p [(Gly293Arg)]	si	No ambulante	8 años
COL6A1 (mRNA aberrante en cDNA de fibroblastos)	si	No ambulante	12 años
en estudio	no	Ambulante	no
COL6A1: het c[(.877G>A); p [(Gly293Arg)]	no	Ambulante	no
COL6A1: het c[(.877G>A); p [(Gly293Arg)]	no	Ambulante	no
COL6A1: het c.[(int18 c.1272+1 )] + het p. [(Gly416Val)]	si	No ambulante	15 años
	si	No ambulante	4 años
COL6A2: hom. 1970-9G>A p.Gly657Alafs*18 , het c. [(1466 G>A)]; p[ (Arg489Gln)], het c[890C>G], p[Pro297Arg]	no	Ambulante	no
COL6A1: het. exon 9: c.817 A>T; p. Lys273*	no	No ambulante	nunca caminó
COL6A1 het (Exon 10:c.877G>A; Gly293Arg)	no	Ambulante	no
COL6A1 hom INT 5 + 4 A>G (at RNA intron 5 retention/wild type, F. Gualandi)	no	Ambulante	no
COL6A1 (exon 10 c.868 G>A; Gly290Arg)	no	No ambulante	4 años
en estudio	no	No ambulante	nunca caminó
COL6A1: het c [(817 A>T)]; p. [(Lys273*)]	no	No ambulante	nunca caminó
COL6A1: het c[(.877G>A); p [(Gly293Arg)]	no	Ambulante	no
p.Gly280Asp en el gen COL6A3, en estat heterozigot	no	Ambulante	no
int.14+1 get G>C COL6A1	no	Ambulante	no
c.6354+1G>A en el gen COL6A3	no	Ambulante	no
COL6A2 (delecion c-1092_1097), exon 12	no	Ambulante	no
Int14+1 Het G>T, COL6A1	no	Ambulante	38 años
COL6A2 p.Cys246:Lys267del	no	Ambulante	no
COL6A3 p.Gly2080Asp	no	Ambulante	no
COL6A1 p.Gly335_Asp352del	no	Ambulante	no
COL6A3 p.Gly2080Asp	no	Ambulante	no
COL6A1 p.Gly359Asp	no	Ambulante	no

Debilidad	Contracturas
proximal EEII, psoas, gluteos	aquiles
cintura escapular, psoas y gluteos.	aquiles, extensores brazos, flexores dedos
proximal EEII, cintura escapular, psoas, gluteos y aductores	aquiles, codos
cintura escapular, psoas, flexores y extensores de dedos	aquiles
triceps , psoas, gluteos	aquiles, extensores codos, flexores dedos
proximal y distal EEIII y EESS	aquiles, codos , dedos y rodillas
proximal EEII y EESS, distal EEII, psoas, gluteos, flexores y extensores cuello	codo, rodillas , muñeca y triceps sural.
proximal EEII	aquiles , isquieotibial y aductores
proximal EEII, axial	aquiles
psoas	aquiles
proximal y distal EEIII y EESS	aquiles, codos, rodillas
proximal y distal EEIII y EESS	codos, rodillas
proximal EEEIII y EESS	aquiles, codos, manos
proximal y distal EEIII y EESS, axial	no
distal EEII, EESS	aquiles
proximal y distal EEIII y EESS, axial	aquiles
proximal EEII y EESS, axial	aquiles, rodillas
proximal y distal EEIII y EESS	aductores, isquiotibiales
proximal y distal EEIII y EESS, axial	codos, rodillas, caderas
proximal y distal EEIII y EESS	aquiles
deltoides, biceps, psoas	aquiles, codos
proximal y distal EEIII y EESS	aquiles, codos, tobillos
proximal EEII y EESS	aquiles, flexores dedos
proximal EEII y EESS	aquiles, codos, flexores dedos
proximal	aquiles, codos, flexores dedos
proximal EEII	aquiles, codos, dedos
proximal, cintura, EEII	no
cintura escapular, psoas, gluteos, flexores y extensores dedos	codos, dedos
cinturas	aquiles, codos
cintura pelvica, cuadriceps	flexores dedos

Hiperlaxitud	Expresión de colágeno VI en músculo	Expresión de colágeno VI en fibroblastos
distal de manos y muñecas	nd	alterado
distal de manos y muñecas	nd	nd
distal de manos y muñecas	nd	nd
n.d.	nd	nd
distal de manos y muñecas	nd	nd
distal de manos y muñecas	reduccción parcial	alterado
distal de manos y muñecas	reduccción parcial	alterado
distal de EEII y EESS	nd	alterado
distal de EEII y EESS	nd	alterado
distal de manos y muñecas	nd	alterado
distal de manos y muñecas	reduccción parcial	alterado
distal de manos y muñecas	reduccción parcial	alterado
distal de manos y muñecas	reduccción parcial	alterado
manos, muñecas y dedos de la mano., rodillas, tobillos y pies	ausente	nd
manos, muñecas y piel.	reduccción parcial	alterado
dedos y manos.	reduccción parcial	nd
dedos de las manos	reduccción parcial	alterado
distal de manos .	nd	alterado
distal muñecas, dedos y manos	nd	nd
distal manos y muñecas.	nd	alterado
distal	no	no
distal manos, pies	no	Si
distal manos y pies	no	Si
distal	no	Si
distal	no	no
no	normal	alterado
no	normal	alterado
dedos	normal	alterado
dedos	normal	alterado
no	n.d.	alterado

## PUBLICACIONES

1. Montero R, Yubero D, Villarroya J, Henares D, Jou C, **Rodríguez MA**, et al. *GDF-15 Is Elevated in Children with Mitochondrial Diseases and Is Induced by Mitochondrial Dysfunction*. PLoS One. 2016 Feb 11;11(2)
2. Simao Cruza, Sebastian Figueroa-Bonapartea , Eduard Gallardo, Alix de Becdelievre , Corine Gartioux, Valerie Allamand, Patricia Pino , **Maria Angels Rodriguez Garcia**, et al. *Bethlem myopathy: long-term follow-up identifies COL6 mutations predicting severe clinical evolution*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 2015 Dec;86(12): 1337-46.
3. Paco S, Casserras T, **Rodríguez MA**, et al. *Transcriptome Analysis of Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts Reveals a Disease Extracellular Matrix Signature and Key Molecular Regulators*. PLoSOne. 2015 Dec 15;10(12).
4. Yubero D, O Callaghan M, Montero R, Ormazabal A, Armstrong J, Espinos C, **Rodríguez MA**, et al. *Association between coenzyme Q 10 and glucose transporter (GLUT1) deficiency*. BMC Pediatrics. 2014 Nov 8;14(1):284
5. Kalko SG, Paco S, Jou C, **Rodríguez MA**, et al. *Transcriptomic profiling of TK2 deficient human skeletal muscle suggests a role for the p53 signalling pathway and identifies growth and differentiation factor-15 as a potential novel biomarker for mitochondrial myopathies*. BMC Genomics. 2014 Feb 1;15:91
6. Paco S, Kalko SG, Jou C, **Rodríguez MA**, et al. *Gene expression profiling identifies molecular pathways associated with collagen VI deficiency and provides novel therapeutic targets*. PLoS One. 2013 Oct 11;8(10)