



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Noves aproximacions terapèutiques en la Distrofia Muscular de Duchenne i validació d'estratègies diagnòstiques en les malalties neuromusculars pediàtriques

Silvia Ferrer Aparicio

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesi doctoral

Programa de doctorat en Genètica Humana (HDK05)

**Noves aproximacions terapèutiques per la Distròfia Muscular de Duchenne
i validació d'estratègies diagnòstiques per als pacients amb malalties
neuromusculars pediàtriques**

Memòria presentada per Sílvia Ferrer Aparicio per optar al grau de Doctora en
Genètica Humana per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat al Laboratori de Neurologia Pediàtrica de l'Institut de Recerca de
la Vall d'Hebron (VHIR), sota la direcció de la Dra. Francina Munell Casadesús i
de la Dra. Maria José Pérez García.

Dra. Francina Munell
Casadesús
Directora

Dra. Maria José Pérez
García
Directora

Dr. Bru Cormand Rifà
Tutor

Sílvia Ferrer Aparicio
Doctoranda

Barcelona, 2018

Benvinguts al llarg viatge...

Agraïments

Després de sis anys ha arribat el moment, ha arribat el moment de plasmar en aquesta tesi tot el que he fet en aquest temps. Ja ho diuen que les tesis tenen moments per tot, moments feliços i distrets però també moments de molt estrès i aquesta no n'és una excepció. Això si, el que m'emporto per sempre és el molt que he après, conegut i divertit fent-la.

Tot això, no hagués estat possible sense l'ajuda, els consells, la paciència de molta gent perquè en un camí com aquest, no s'arriba al final si hi vas sol. És per això que ara toca agrair-vos a tots vosaltres tot el que heu fet per mi.

Primet de tot, moltes gràcies Francina. Gràcies per donar-me aquesta oportunitat i tenir-me en compte sempre. Però especialment, per demostrar-me el que és viure una professió amb passió de veritat. Gràcies per guiar-me i ajudar-me a arribar fins aquí. Gràcies a tu també, Alfons. Sóc conscient que ets un dels grans partícips de que aquesta tesi hagi estat possible però també gràcies pel clima de bon humor que sempre impregnes a les reunions de grup. I benvinguda Belén, t'agraeixo que et preocupis per nosaltres des del primer dia.

Moltes gràcies Mari, per tots els consells que m'has donat i el suport des del principi. Ara, a pels *papers!*

Amb qui seguir si no és amb tu? Anna. No m'imagino que hagués estat de mi tot aquest temps si no t'arribo a tenir al meu costat, molt més horrible segurament. No crec que hi hagi algú que quan pensi en nosaltres pensi només en una, som un pack indivisible. Gràcies per ser una amiga, per ajudar-me durant tot aquest temps, per aguantar-me en TOTS els estats d'ànim que poden existir, per saber quan m'has de dir "*Anem a pendre l'aire?*" i per sobre de totes les coses, pels balls, les risses, el bon rotllo, les porres i tot el que està per venir. Se'ns dubte una de les coses que m'emportaré per sempre ets tu, una de les millors coses d'aquest doctorat. (*Toma declaració d'amor, eh?*) Ens depari el que ens depari el futur, sempre estaré allà per tu, encara que segurament treballem juntes en la nostre empresa de *wedding planner*. ;)

Haig d'agrair a tots aquells que heu passat pel laboratori de Neurologia Pediàtrica i que m'heu ajudat i convertit en qui sóc avui en dia. Especialment gràcies a tots aquells que m'emporto com

a amics: Miquel, la persona que més ha patit la meua mala llet (tot justificat, oi?) però també vam riure moltíssim i ho seguim fent! Míriam, estàs massa lluny i trobo a faltar les teves històries i que diguis les coses sense filtre, espero que algun dia vegis això.

Paula y Myriam, mis PyM. Gràcies por estos últimos meses, sobretodo por aguantar estos últimos meses con mis nerviós, mi humor y mis "*Os odioo*", sois dos soles y me habéis hecho mucho más fácil éste tiempo. Paula, explosiva, habladora y tan buena persona, gracias. Y a ti Myriam, hasta con tu empanamiento desprendes un buen rollo que no creo ni te des cuenta, gracias por las clases de euskera.

Éri, mira que irte a Madrid... Te echo de menos y por eso, de vez en cuando te mando corazoncitos por Instagram. Tu y Júlia habéis sido mis másters preferidas y por eso os he dejado para el final. Eres una amiga genial y prometo que en cuanto esto acabe iré más a verte.

Júlia... no sé que dir-te. Som tan igualetes i ens entenem tan bé. Et compensaré per tot el que m'has aguantat aquests últims mesos, això només ho faria una amiga com tu. Espero que fem moltes coses juntes perquè des del viatge a Madrid que trobo a faltar dormir amb tu! :P

I a tu també Júlia Sala! Gràcies per aparèixer de cop, ens devem moltes birres!

Ara hem toca agrair al meu segon laboratori, Patologia Mitocondrial i no és que ho digui jo, ho dieu vosaltres. No he vist mai un grup de persones tan capaços i tan disposats a ajudar a qualsevol, treballar amb vosaltres és un luxe i és odiós no fer-ho més. Gràcies Tomàs per les *masterclass* de ciència cada cop que tenia un dubte, m'has ensenyat com m'agradaria ser. Gracias Javi por tener siempre una sonrisa y ayudarme siempre que lo he necesitado, aunque me pidas cotilleos a cambio! Gràcies Ferran pel plasma. No, és broma. Com no agrair que siguis tan bon amic i sempre de tan bon humor? És un plaer coincidir amb tu, a veure si tornem a les vhirres! Gràcies Lídia, ets un sol, sempre disponible per compartir penes i alegries. Quan vulguis carreguem seqüenciadors juntes! Gracias Alberto, ya sabes, si llevas *slides*, no saludes! ;) I gràcies també, Yoli, Cora i Raquel, completeu un equip envejable.

Et toca a tu, Jordiet. Quin gran descobriment! Probablement un dels millors, sense cap mena de dubte. Gràcies per tot, absolutament. No es pot resumir tants consells, tantes xerrades, tantes festes, tan bon rotllo... Ets essencial ara, que ho sàpigues. La Gal·la està per davant de tot i ara que això s'acaba em moro per conèixer-la, però suposo que una última festa, si no?

Manu, aunque creas que si, no me olvido de ti. Gracias por compartir conmigo muchos momentos. Intentaré no ser tan desastre y escribirte más.

Cris Boada, sé que encara que no ens veiem cada dia sempre estàs allà. Gràcies per tota l'ajuda que m'has brindat i espero que et vagi genial en aquesta nova aventura vinícola. Hem d'establir dies per posar-nos al dia!

Annita, gràcies per estar sempre disposada a ajudar i per totes les coses que hem fet i que ens queden per fer juntes! El primer, un *room escape!* Sandra, espero que et donin una plaça aviat, te la mereixes. Per tot el que treballes i pel teu bon humor, gràcies.

Moltes gràcies a les compis de cafè, Thaís i Annabelle, per les risses, els cotilleos i els ànims sempre. Els meus moments preferits del dia, se'ns dubte.

Gràcies Quim i Pablo, pel bon rotllo. Quim, parles poc però no et cal, amb la mirada ja ho dius tot. Pablo, tu parles pels dos i ets únic per la teva bogeria i el teu bon humor. I al torn de tarda, Tao i Marga, perquè marxar de la feina amb un somriure és sobretot gràcies a vosaltres i a que sou persones extraordinàries. Fátima i Helena, que boges esteu però quina sort de tenir-vos.

A les meves xuxis: Ana, Saladrich, Laura Sala, Mel, Emma, Patri, Sonia, Maria. La meitat repartides pel món i l'altre meitat tan difícils de fer coincidir. Ens veiem poc però quan passa és tan intens que et deixa amb ganes de més. No es poden desitjar unes amigues millors.

Mariona, gràcies per ajudar-me amb els meus dubtes de paperassa però sobretot per ser una amiga. No he tingut amb ningú la connexió ràpida que vam tenir el conèixer-nos, vegem-nos ja!

Gracias família Vecino, por ser también mi familia i por ayudarme a que esta tesis quede tan bien.

Os quiero.

Us toca a vosaltres, la part més important de mi. La meva família. Gràcies per tot, sempre. Abril, has arribat fa res però ets tot el que està bé en aquest món, i la llum d'aquests últims dies intensos. Però sobretot a tu, mama. Enumerar per tot el que et dono les gràcies em portaria 4 pàgines més però principalment, per aguantar els meus rampells de mala llet i confiar sempre en mi. Em dones la seguretat i la força que molts cops em fa falta. Gràcies per existir, t'estimo.

Y por último a ti, Eriz. Gracias por estar ahí y por los ánimos, sé que siempre estás ahí. Gracias por quererme y estar ahí, nos queda mucho por vivir o al menos, por viajar! Te quiero. Gracias también Ana, Aitor y Oier por el apoyo.

ÍNDEX

Abreviatures	5
INTRODUCCIÓ	11
1.1 Múscul esquelètic	13
1.1.1 Estructura bàsica i organització	14
1.1.2 Mecanisme de la contracció muscular	16
1.1.3 Heterogeneïtat del teixit muscular	17
1.1.4 Regeneració muscular	19
1.1.5 Paper de les hormones sexuals en el múscul	23
1.1.5.1 Efectes dels estrògens	24
1.1.5.2 Estrògens i dany muscular, inflamació i reparació	24
1.2 Les malalties neuromusculars (NMD)	26
1.2.1 Diagnòstic de les NMD	29
1.2.1.1 Diagnòstic genètic: tècniques de seqüenciació massiva (NGS)	30
1.3 La Distròfia Muscular de Duchenne	33
1.3.1 Aspectes clínics	33
1.3.2 Distrofina	34
1.3.3 Canvis en absència de distrofina	36
1.3.4 Models experimentals de DMD	39
1.3.4.1 Models de cèl·lules mare	39
1.3.4.2 Models animals no-mamífers	40
1.3.4.3 Models de rosegadors	41
1.3.4.4 Grans animals com a models de DMD	43
1.3.5 Tractaments actuals i noves teràpies	45
1.3.5.1 Teràpies gèniques	45
1.3.5.2 Teràpies moduladores de la patologia	52
1.3.6 Ús de nanopartícules per l'alliberament de fàrmacs a múscul	54



OBJECTIUS	57
MATERIAL I MÈTODES	61
3.1 Animals	63
3.2 Mostres humanes	63
3.3 Tractaments	64
3.3.1 17 β -Estradiol	64
3.3.2 LM11A-31	66
3.3.3 Fàrmacs <i>read-through</i> i ús de nanopartícules	67
3.3.3.1 Fàrmacs emprats	67
3.3.3.2 Tractament amb PTC124 intraperitoneal	68
3.3.3.3 Nanopartícules	68
3.3.3.4 Biodistribució de les nanopartícules de primera generació	69
3.3.3.5 Biodistribució de les nanopartícules de segona generació	70
3.3.3.6 Tractament amb NPs carregades amb PTC124	70
3.3.3.7 Quantificació de la fluorescència de l'animal in vivo i dels teixits	71
3.4 Tests funcionals	73
3.5 Recollida de mostres de ratolins	74
3.6 Mesura dels nivells de CK i estradiol	74
3.7 Estudi histològic del múscul	75
3.8 Anàlisi d'expressió gènica per Microarrays	76
3.8.1 Preparació dels teixits	76
3.8.2 Extracció d'ARN total	76
3.8.3 Microarrays d'expressió	77
3.8.4 Anàlisi bioinformàtic	77
3.9 Comprovació de l'expressió gènica diferencial	78

3.9.1 Retrotranscripció (RT-PCR)	78
3.9.2 PCR a temps real (qPCR)	79
3.10 Anàlisi proteic	81
3.10.1 Extracció de proteïnes	81
3.10.2 Quantificació de proteïnes	81
3.10.3 Anàlisi de proteïnes per electroforesi	81
3.10.1.1 Preparació de les mostres	81
3.10.1.2 Tècnica del Western Blot	82
3.11 Anàlisi per immunofluorescència (IF)	83
3.12 Anàlisi estadístic	85
3.13 Diagnòstic molecular	86
3.13.1 Diagnòstic clínic	86
3.13.2 Proves realitzades	97
3.13.3 Extracció d'ADN de sang	98
3.13.4 Extracció d'ADN de saliva	99
3.13.5 Tècniques de seqüenciació massiva (NGS)	99
3.13.6 Anàlisi dels resultats de NGS	101
3.13.7 Validació per PCR-seqüenciació Sanger	103
3.13.7.1 Disseny de <i>primers</i>	103
3.13.7.2 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	106
3.13.7.3 Purificació de l'amplicó a seqüenciar	106
3.13.7.4 Reacció de seqüència i seqüenciació Sanger	107
3.13.7.5 Validació de variants de significat incert (VUS)	108
 RESULTATS	 109
4.1 Resultats del tractament amb 17 β -Estradiol	111
4.2 Resultats del tractament amb LM11A-31	143
4.3 Resultats del tractament amb PTC124 i NPs	149
4.3.1 Tractament amb PTC intraperitoneal	149

4.3.2 Ús de nanopartícules de primera generació	151
4. 3.3 Ús de nanopartícules de segona generació	154
4.3.4 Tractament amb NPs carregades am PTC124	157
4.4 Resultats del diagnòstic genètic de pacients amb NMD	163
DISCUSSIÓ	173
Discussió del tractament de 17 β -Estradiol	175
Discussió del tractament amb PTC124 i ús de NPs	195
Discussió del diagnòstic genètic de pacients amb NMD	199
CONCLUSIONS	209
BIBLIOGRAFIA	213
Annex de figures	231

Abreviatures

- 6MWT: de l'anglès, *6-minute walking test*
- aCGH: de l'anglès, *Microarray-based Comparative Genomic Hybridization*
- ADN: àcid desoxirribonucleic
- Akt: de l'anglès, *Protein Kinase B* (PKB)
- ALS: de l'anglès, *Amyotrophic Lateral Sclerosis*
- AON: de l'anglès, *Antisense Oligonucleotides*
- APS: de l'anglès, *Ammonium Persulphate*
- ARNg: guia d'ARN per l'edició gènica amb CRISPR/Cas9
- ARNm: àcid ribonucleic missatger
- ATP: Adenosin Trifosfat
- ATPasa: Adenosin Trifosfat Sintasa
- Bax: de l'anglès, *BCL2 Associated X*
- Bcl2: de l'anglès, *B-Cell CLL/Lymphoma 2*
- BDNF: de l'anglès,
- BMD: Distròfia muscular de Becker
- BSA: de l'anglès, *Bovine Serum Albumine*
- CAPN3: de l'anglès, *Calpain 3*
- Cas9: de l'anglès, *CRISPR associated protein 9*
- Ca⁺²: ions calci.
- CDG: defectes congènits de glicosilació
- CK: de l'anglès, *Creatine Kinasa*
- CM: miopatia congènita
- CMD: distròfies musculars congènites
- CMT: neuropaties neuronals sensorials i autonòmiques, de l'anglès *Charcot-Marie-Tooth*
- CNV: de l'anglès, *Copy Number Variant*
- COG6: de l'anglès, *Component Of Oligomeric Golgi Complex 6*
- COL6A1: de l'anglès, *Collagen Type VI Alpha 1 Chain*
- COL6A2: de l'anglès, *Collagen Type VI Alpha 2 Chain*

COL6A3: de l'anglès, *Collagen Type VI Alpha 3 Chain*

CRISPR: de l'anglès, *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

CTL: condició control

CTX: cardiotoxina, verí de cobra

CXMD: de l'anglès, *Canine X-linked muscular dystrophy*

ddNTP: dideoxinucleòsid trifosfat

DMD: Distròfia muscular de Duchenne

DMSO: de l'anglès, *Dimethyl Sulfoxide*

dNTP: deoxinucleòsid trifosfato

DNM2: de l'anglès, *Dynamin 2*

DOK7: de l'anglès, *Docking Protein 7*

DPC: de l'anglès, *Dystrophin Protein Complex*

Drp2: de l'anglès, *Dystrophin-related protein 2*

Dys1: de l'anglès, *Deoxyhypusine Synthase*

DYSF: de l'anglès, *Dysferlin*

E2: 17 β -Estradiol

ECM: Matriu extracel·lular

EMG: electromiograma

EPR: efecte de permeabilitat i retenció.

ER: receptor d'estrògens

ER α : de l'anglès, *Estrogen Receptor alpha*

ER β : de l'anglès, *Estrogen Receptor beta*

FDA: nom de l'agència americana, *Food and Drug Administration*

FKRP: de l'anglès, *Fukutin-Related protein*

GAPDH: de l'anglès, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

GDR: grup de degeneració-regeneració

GMG: gastrocnemi

GO: Gene ontology

GRMD: de l'anglès, *Golden retriever muscular dystrophy*

HE: tinció d'hematoxilina-eosina.

HNA: neuropaties focals hereditàries, de l'anglès *Hereditary neuralgic amyotrophy*

HPLC: de l'anglès, *High-performance liquid chromatography*

HRP: de l'anglès, *Horseradish Peroxidase*

HRT: de l'anglès, *Hormone Replacement Therapy*

HSN: neuropaties sensorials autonòmiques hereditàries, de l'anglès *Hereditary Sensory & Autonomic Neuropathy*

IGF-1: de l'anglès, *Insulin like growth factor 1*

IGV: programa *Integrative Genomics Viewer*

IL-1 β : de l'anglès, *Interleukin 1-beta*

IL-10: de l'anglès, *Interleukin 10*

iPSCs: de l'anglès, *Induced pluripotent stem cells*

LAMA2: de l'anglès, *Laminin subunit alpha 2*

LGMD: de l'anglès, *Limb Girdle Muscle Dystrophy*

LMNA: de l'anglès, *Lamin A/C*

MEF2: de l'anglès, *Myocyte Enhancer Factor 2*

MHCI: de l'anglès, *Myosin Heavy Chain I*

MHCd: de l'anglès, *Developmental Myosin Heavy Chain*

mIGF o MIGF: forma autocrina d'IGF-1.

MLPA: de l'anglès, *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

MMP-9: de l'anglès, *Matrix Metalloproteinase 9*

MPS: de l'anglès, *Mononuclear Phagocyte System*

MSN: de l'anglès, *Mesoporous Silica Nanoparticles*

MSNsPEG: Nanopartícules mesoporoses de sílice funcionalitzades amb molècules PEG

MSNsPEG-PTC: les nanopartícules anteriors, carregades amb PTC124

Mstn: de l'anglès, *Myostatin*

MRI: ressonància magnètica de cos sencer

MTM1: de l'anglès, *Myotubularin 1*

MTMR14: de l'anglès, *Myotubularin related protein 14*

MyoD: de l'anglès, *Myogenic differentiation*

Myog: de l'anglès, *Myogenin (Myogenic Factor 4)*

NCX: de l'anglès, *Sodium/Calcium Exchanger 1*

NEB: de l'anglès, *Nebulin*

NGF: de l'anglès, *Nerve Growth Factor*

NGS: de l'anglès, *Next Generation Sequencing*

NICE: nom de l'agència britànica, *The National Institute for Health and Care Excellence*

nNOS: òxid nítric sintasa neuronal

NMD: de l'anglès, *Neuromuscular Disorders*

NMD*: de l'anglès, *Nonsense-Mediated Decay*

NP: nanopartícules *Brain Derived Neurotrophic Factor*

Ntf3: de l'anglès, *Neurotrophin 3*

Ntf4/5: de l'anglès, *Neurotrophin 4/5*

O/N: durant una nit, en anglès, *Over-night*

ORAI1: de l'anglès, *ORAI Calcium Release-Activated Calcium Modulator 1*

p75^{NTR} (Ngfr): de l'anglès, *Nerve growth factor receptor*

p-Akt: forma fosforilada i activa d'Akt

Pax7: de l'anglès, *Paired box 7*

PBS: de l'anglès, *Phosphate buffered saline*

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

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PEG: polímer biodegradable

PI3K: de l'anglès, *Fosfatidilinositol 3-kinasa*

PLEC: de l'anglès, *Plectin*

PTC: de l'anglès, *Premature Termination Codon*

PVDF: de l'anglès, *Polyvinylidene difluoride*

qPCR: PCR quantitativa

RNASeq: seqüenciació del transcriptoma

ROS: espècies reactives d'oxigen

RS: reticle sarcoplasmàtic

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

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

Ryr1: de l'anglès, *Ryanodine receptor 1*

S18: subunitat petita del ribosoma

SC: cèl·lules satèl·lit

SDH: Succinat deshidrogenasa

SDS: de l'anglès, *Sodium Dodecylsulphate*

SEPN1: de l'anglès, *Selenoprotein N 1*

SERCA1a: de l'anglès, *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 1*

SERCA2a: de l'anglès, *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2*

SERM: de l'anglès, *Selective Estrogen Receptor Modulator*

SGCG: de l'anglès, *Sarcoglycan gamma*

SMA: de l'anglès, *Spinal Muscular Atrophy*

SOP: de l'anglès, *Standard of Procedure*

STIM1: de l'anglès, *Stromal interaction molecule 1*

TEMED: de l'anglès, *Tetramethylethylenediamine*

TGF β : de l'anglès, *Transforming Growth Factor β*

TNF α : de l'anglès, *Tumor Necrosis Factor alpha*

TPM3: de l'anglès, *Tropomyosin 3*

TrkA: de l'anglès, *Tyrosine Kinase Receptor A*

TrkB: de l'anglès, *Tyrosine Kinase Receptor B*

TrkC: de l'anglès, *Tyrosine Kinase Receptor C*

TRP: de l'anglès, *Transient receptor potential channel*

TSO: TruSight One panel (*Illumina*)

TTN: de l'anglès, *Titin*

Utrn: de l'anglès, *Utrophin*

VUS: de l'anglès, *Variant of Uncertain Significance*

WES: de l'anglès, *Whole Exome Sequencing*

WGS: de l'anglès, *Whole Genome Sequencing*

WISP2: de l'anglès, *WNT1 inducible signaling pathway protein 2*

WT: de l'anglès, *wild-type*

[Ca²⁺]_i: concentració d'ions calci intracel·lular.

α -DG: de l'anglès, *Alpha-dystroglycan*

β -DG: de l'anglès, *Beta-dystroglycan*

INTRODUCCIÓ

1.1 MÚSCUL ESQUELÈTIC

El múscul esquelètic és un dels teixits més dinàmics i plàstics del cos. Comprèn el 40% del pes i conté el 50-75% de totes les proteïnes del cos, pel que s'encarrega del 30-50% del recanvi proteic.

Està compost principalment per aigua (75%), proteïnes (20%), i la resta són sals inorgàniques, minerals, greix i carbohidrats. La massa muscular depèn de l'equilibri entre la síntesi i la degradació de proteïnes i és sensible a factors nutricionals, hormonal...¹

És un teixit que contribueix a moltes funcions corporals, com s'observa a la figura 1:

- Des del punt de vista mecànic, s'encarrega de convertir energia química en energia mecànica per generar força, mantenir la postura i produir moviment.
- Des del punt de vista metabòlic, contribueix al metabolisme d'energia basal servint de magatzem d'aminoàcids i carbohidrats, a la producció de calor per mantenir la temperatura corporal i al consum de la major part d'oxigen durant l'activitat física i l'exercici.

L'alliberament d'aminoàcids del múscul contribueix al manteniment dels nivells de glucosa en sang en condicions de fam.²

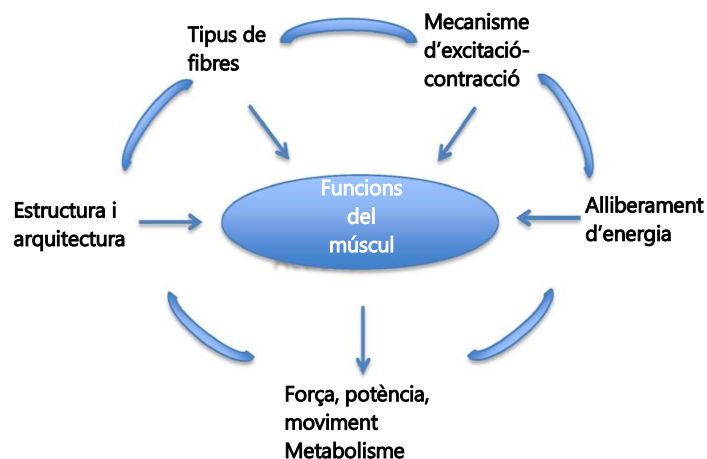


Figura 1: Funcions i influències principals del múscul esquelètic. Extret i adaptat de Frontera, WR, et. al., 2015.

1.1.1. Estructura bàsica i organització del múscul esquelètic

L'arquitectura del múscul es caracteritza per un ben definit arranjament de les fibres musculars, en el que s'anomena miofibres, i el teixit conjuntiu associat.

A nivell de tot el múscul, la mida d'un múscul és determinada majoritàriament pel número i diàmetre de les fibres musculars individuals, tot i que, la infiltració de greix i de teixit conjuntiu alteren aquesta relació.

Les fibres musculars són postmitòtiques i multinucleades, on cada nucli controla el tipus de proteïna sintetitzada a una regió específica de la cèl·lula, els dominis nuclears.

El múscul està rodejat per una capa de teixit conjuntiu, anomenat epimisi. Dins d'aquest múscul, les fibres musculars s'ordenen en paquets i aquests s'envolten per una altra capa de teixit conjuntiu, el perimisi. Una fibra muscular única (que mesura 100µm de diàmetre i 1cm de llarg) també està envoltada per una membrana cel·lular o sarcolemma i per un teixit conjuntiu reticular, l'endomisi. Associades al sarcolemma hi ha un complex de moltes proteïnes físicament connectades a l'estructura interna del miofilaments. L'absència o mala funció d'una d'aquestes proteïnes produeix el dany del sarcolemma, debilitat muscular i atròfia, és a dir, una patologia neuromuscular (figura 2).¹

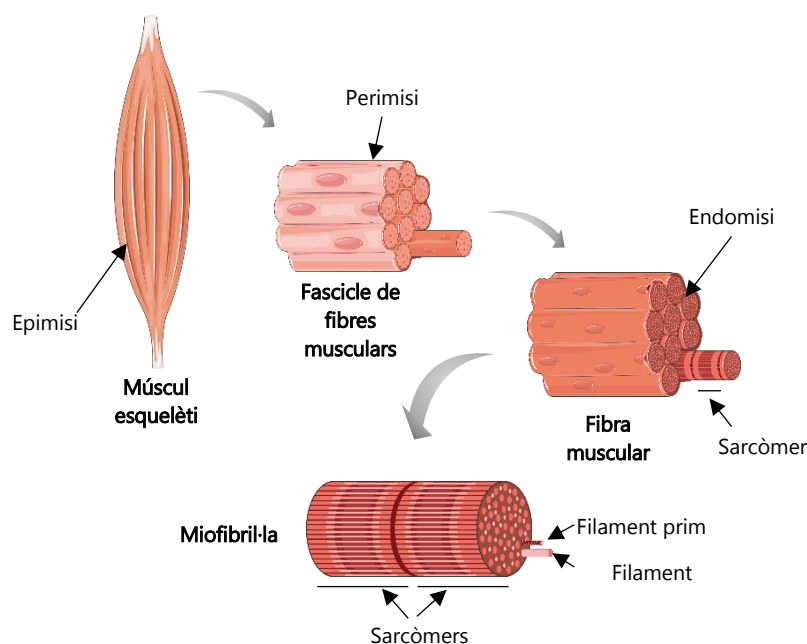


Figura 2: Estructura del múscul esquelètic.

La fibra muscular també té el seu sarcoplasma on es troben tots els orgànuls citoplasmàtics però sobretot, consisteix en miofibril·les que ocupen la major part de l'espai empenyent els nuclis cap a la perifèria, que tenen un arranjament ben definit formant bandes creuades que caracteritzen les fibres musculars.³

Les miofibril·les són miofilaments arranjats en un ordre funcional per respondre a la contracció amb l'ajuda de proteïnes del citoesquelet com la plectina, la filamina o la distrofina. Hi ha dos tipus de miofilaments:

- Filament gruixut: consisteix en paquets de miosina unides l'una a l'altra en paral·lel i constituint la banda A (correspon a tota la llargada del filament). La part central de la banda A, la banda H, indica la zona on no se superposa amb el filament prim.
- Filament prim: estan compostos estructuralment per molècules d'actina col·locades en paral·lel i formant la banda I, la zona on no hi ha superposició amb els filaments gruixuts. Tenen altres proteïnes reguladores associades com la Tropomiosina o la Troponina, fonamentals per a la contracció.

La miofibril·la consisteix en una alternació de bandes A-I amb: la banda H enmig de la A, on només hi ha filament gruixut; la semibanda A, on hi ha el complex actina-miosina; la línia M (enmig de la banda H); on les cues de les miosines s'uneixen entre si; i la línia Z (enmig de la línia I), on els filaments prim dels sarcòmers adjacents s'uneixen (figura 3).

El fragment de miofibril·la entre dues bandes Z és el sarcòmer, la unitat funcional de la fibra muscular. Gràcies a la unió dels filaments prim dels sarcòmers adjacents a nivell de la línia Z, la contracció dels sarcòmers individuals resulta en la contracció de tot el múscul.⁴ L'estabilitat i integritat del sarcòmer es manté gràcies a proteïnes del citoesquelet com la titina i la nebulina.⁵

Per a què el múscul esquelètic dugui a terme la seva funció és essencial la innervació. Durant el desenvolupament, una fibra és innervada per més d'una motoneurona. Posteriorment es produeix un canvi, passant una motoneurona a poder innervar varies fibres, les quals tindran les mateixes característiques.

L'entrenament, l'edat, les patologies, entre altres factors, canvien l'estructura i la funció dels elements anteriors.⁶

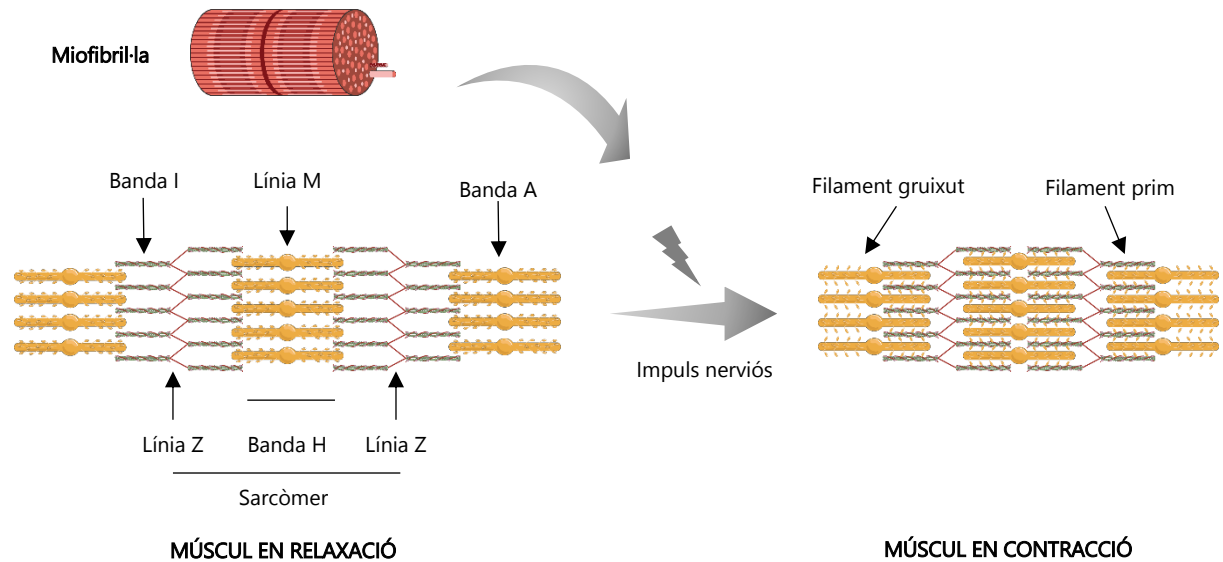


Figura 3: Composició de les miofibril·les i mecanisme de contracció muscular.

1.1.2. Mecanisme de la contracció muscular

La contracció és possible gràcies a la presència d'estructures sarcolèmiques i sarcoplasmàtiques que permeten l'acoblament excitació-contracció.

El mecanisme bàsic de la contracció és l'alliberament d'ions Ca^{+2} per part del reticle sarcoplasmàtic i la unió d'aquests ions a la subunitat C de la Troponina, permetent el lliscament dels filaments prim sobre els gruixuts.

El reticle sarcoplasmàtic és una modificació de reticle endoplasmàtic llis, disposat en túbuls envoltant les miofibril·les. Es divideix en cisternes fenestrades i cisternes terminals. Aquestes últimes tenen un patró horitzontal i retenen els ions Ca^{+2} que seran alliberats quan arriba un impuls nerviós, fent-lo disponible per a la Troponina C.⁷

L'alliberament d'aquests ions és permès per unes estructures sarcolèmiques, els túbuls transversos o Túbuls T, que són una invaginació del sarcolemma. Tenen el rol de conduir el potencial d'acció nerviós dins la cèl·lula, estant en contacte amb les cisternes terminals del reticle i fent que s'alliberi el Ca^{+2} .

L'associació entre un túbul T i dues cisternes terminals s'anomena Tríada.⁸

Una part fonamental per la contracció en particular i pel teixit muscular en general són els mitocondris, que formen una xarxa tridimensional per tota la cèl·lula generant l'energia química requerida, ATP, quan aquest disposa d'oxigen. Aquesta energia

química es convertirà en energia mecànica per l'activitat ATPasa de la miosina, permetent així el lliscament dels filaments primis i per tant, de la contracció.

L'acoblament d'excitació-contracció és una coordinació de dos processos necessaris per la generació de força, la transmissió de l'impuls nerviós a la Tríada seguit de l'alliberament de calci de les cisternes del reticle sarcoplasmàtic i la interacció entre actina i miosina.

El potencial d'acció que arriba a la membrana de les fibres es condueix a l'interior via el sistema Túbul T. Una subunitat sensible al voltatge dels receptors de dihidropiridina del Túbul T s'obre i permet un corrent intern de calci, això desencadena l'obertura dels receptors de rianodina de les cisternes terminals del reticle sarcoplasmàtic i allibera grans quantitats de calci al sarcoplasma. Aquest alliberament genera que la proteïna reguladora Troponina C s'uneixi a l'actina del filament prim i desplaça la Tropomiosina, bloquejant el lloc actiu de l'actina.

Deixar accessible el lloc actiu de l'actina permet que s'hi uneixi el cap de la miosina. L'ATP i l'ATPasa del cap de la miosina permeten el despenament de l'actina de la miosina i la formació d'un nou pont. El resultat final és el lliscament dels filaments d'actina i miosina i la generació de força.

Aquesta seqüència d'esdeveniments dins de la cèl·lula és modulada per molts gens, els quals poden causar trastorns neuromusculars si es veuen alterats..^{1,6,9}

1.1.3. Heterogeneïtat del teixit muscular

El múscul consta d'una elevada variabilitat bioquímica, mecànica i metabòlica de les seves fibres individuals. La presència de diferents tipus de fibres en un mateix múscul fa que aquest tingui una capacitat elevada d'adaptació a diferents patrons d'activitat imposats per les motoneurones, i permet la participació del múscul en activitats amb demanda metabòlica i mecànica diversa. Depenent de la funció del grup muscular i del tipus d'activitat que duu a terme, cadascun conté una proporció diferent de les diferents miofibres i segons això, els músculs poden ser classificats com a glicolítics (com el diafragma) o oxidatius (com el quàdriceps) d'acord amb la seva composició en tipus de miofibres i el seu metabolisme.^{10,11}

Les fibres són classificades per:

1. Color, segons el contingut de mioglobina: blanques o vermelles.
2. Propietats contràctils de la unitat motora responent a estímuls elèctrics.
3. Velocitat d'escurçament durant una única contracció: ràpida o lenta.
4. Grau de fatigabilitat en una activació sostinguda: fatigable o resistent a la fatiga.
5. Predomini de determinades vies metabòliques o enzimàtiques: oxidatives o glicolítiques.
6. Reacció de tinció histoenzimàtica (ATPases, SDH...)
7. Recaptació del calci pel reticle sarcoplasmàtic: ràpida o lenta.
8. Expressió de determinades isoformes de la miosina.¹

La classificació més coneguda seguint alguns dels criteris anteriors és:

- **Fibres de tipus I:** són de contracció lenta i generen poca força però són molt resistents a la fatiga, pel que són crítiques per la contracció muscular sostinguda. El seu metabolisme és predominantment aeròbic, generant ATP per fosforilació oxidativa. Expressen la isoforma I de la cadena pesada de la miosina (MHCI).
- **Fibres de tipus IIA:** són de contracció ràpida i tenen una bona resistència a la fatiga, tot i que no tant com les de tipus I. Estan involucrades en activitats que requereixen velocitat però també força i potència. La producció d'ATP s'obté principalment de fosforilació oxidativa.
- **Fibres de tipus IIB:** són anomenades IIX en humans, tenen contracció molt ràpida i es fatiguen fàcilment. S'usen quan es requereix una explosió d'energia. La via de creació d'ATP és la glicòlisi anaeròbica.

Taula 1: Resum de les propietats i característiques dels diferents tipus de fibres musculars

Característiques	Fibres tipus I	Fibres tipus IIA	Fibres tipus IIB
Diàmetre	Petit	Intermedi	Gran
Contingut en mioglobina	Alt	Intermedi	Baix
Capil·lars	Molts	Intermedi	Pocs
Sistema energètic predominant	Aeròbic	Aeròbic/Anaeròbic	Anaeròbic
Resistència a la fatiga	Alta	Intermèdia	Baixa
Velocitat de contracció	Lenta	Ràpida	Ràpida
Potència	+	++	+++
Resistència	+++	++	+

1.1.4. Regeneració muscular

Les miofibres madures són cèl·lules plàstiques que poden canviar en la mida (atròfia/hipertròfia) i en els tipus de fibres (de ràpid a lent o de lent a ràpid). A més, són capaces de reparar danys locals amb estructures subcel·lulars específiques, com per exemple: les disruptcions de la membrana plasmàtica induïdes per contraccions musculars, sobretot les que es caracteritzen per ser mantingudes, poden ser reparades simplement per la fusió de vesícules subsarcolèmiques. En aquest procés és essencial la participació de la proteïna disferlina.

En aquests casos, hi ha formes de dany focal miofibril·lar que són processos reversibles, no causen la mort cel·lular i tenen lloc sense canvis histològics obvis ni respostes inflamatòries. Però també, el múscul esquelètic dels mamífers té la capacitat de completar un ràpid i extens procés de regeneració en resposta a dany sever, ja sigui per un trauma directe, per defectes genètics innats, etc.

Aquest procés, en molts aspectes (però no tots) recapitula la seqüència d'esdeveniments que es produeixen durant la miogènesi embrionària.¹²

La regeneració muscular compta amb 3 fases ben distingides, i està representada a la figura 4:

1. Fase degenerativa i inflamatòria: el dany sever produeix la necrosi de fibres musculars o de segments, que comporta la dissolució de la membrana plasmàtica i

un increment de la permeabilització de la miofibra. La disrupció de la integritat de la miofibra es reflecteix en un increment dels nivells en sang de creatina cinasa muscular (CK), que normalment es troba únicament a citosol. En humans i models animals, s'observa un increment de CK en sèrum després d'un estrès mecànic i durant el curs de diverses patologies musculars caracteritzades per la inducció del procés regeneratiu.

La permeabilització del sarcolemma produeix un influx creixent de calci que condueix a l'activació de proteases dependents de calci com la calpaïna. Aquestes proteases produeixen la desintegració ràpida de miofibril·les i altres constituents cel·lulars. La degradació de proteïnes plasmàtiques i l'activació de la cascada del complement indueixen el reclutament quimiotàctic de leucòcits.¹³

Hi ha dues poblacions de leucòcits que intervenen en la regeneració: neutròfils i macròfags.

Els neutròfils són els primers en envair el lloc del dany, normalment són detectats a les 24h post-dany i desapareixen després de les 36-48h post-dany. Entren al teixit danyat per interacció amb molècules adhesives de les cèl·lules vasculars endotelials, un procés que és mediat per la interacció de la β -integrina dels neutròfils amb lligands vasculars.

L'activitat fagocítica dels neutròfils implica l'alliberament d'elevades concentracions de radicals lliures i proteases, a més de la secreció de citocines pro inflamatòries que estimulen que acudeixin al focus de regeneració altres poblacions de leucòcits, els macròfags.¹⁴

Els fagòcits eren tradicionalment relacionat amb l'eliminació dels residus produïts per la necrosi però s'ha vist que tenen un rol més actiu en la regeneració. Durant el procés actuen dues subpoblacions de macròfags:

- La població M1, els macròfags inflamatoris: són els primers en envair el teixit i estan caracteritzats per l'expressió de CD68 a la seva superfície. La seva concentració més alta al teixit injuriat és a les 24 hores post-dany, i s'encarreguen de secretar citocines pro inflamatòries, com $\text{TNF}\alpha$ i $\text{IL-1}\beta$, i també de la fagocitosis del teixit necròtic.

- La segona població, és la M2, els macròfags antiinflamatoris: deriven dels anteriors, però han fet un canvi de fenotip i expressen CD163 a la seva superfície. Es troben majoritàriament entre els 2 i 4 dies post-dany. Secreten citocines antiinflamatòries, com IL-10, que contribueixen a acabar amb la inflamació i alliberen factors que milloren la proliferació del precursors miogènics, el creixement i la diferenciació.^{12,14}
2. Fase d'activació de cèl·lules satèl·lit (SC) i diferenciació: la capacitat regenerativa està garantida per un mecanisme intrínsec que recupera l'aparell contràctil danyat i que està liderat per les cèl·lules mare del múscul, anomenades cèl·lules satèl·lit per la seva localització característica. Van ser descrites per Alexander Mauro el 1961¹⁵, que les va definir com unes cèl·lules estretament associades a la perifèria de les miofibres de les granotes. Són mioblasts en estat quiescent que fallen en la fusió amb altres mioblasts durant el desenvolupament embrionari i estan llestos per recapitular quan la cèl·lula multinucleada està danyada i és necessari el creixement i la reparació. Es localitzen estrictament associades amb el sarcolemma, entre la làmina basal i la membrana.¹⁶

S'activen per estímuls fisiològics i patològics que les indueixen a proliferar de forma ràpida a partir del segon dia després del dany. Les cèl·lules satèl·lit presenten una divisió asimètrica de forma que donen lloc a dues subpoblacions:

- Per un costat, genera una cèl·lula filla que no es diferencia i es queda en forma quiescent, el que permet mantenir el nínxol de cèl·lules mare.
- I per l'altre, genera una població de mioblasts que mitjançant la posterior diferenciació, poden fusionar-se amb fibres preexistents reparant fibres danyades o fusionar-se entre ells per formar nous miotubs. Durant la regeneració, aquests miotubs expressen MHCd i altres marcadors només presents durant el desenvolupament embrionari.^{14,17}

Les fibres de nova formació tenen un calibre petit, un nucli central i a més, són basofíliques. Un cop s'han fusionat les cèl·lules miogèniques, les miofibres incrementen de mida i el mionucli es mou a la perifèria. En condicions normals, el múscul regenerat no es distingeix del múscul no danyat.¹³

Recentment, s'ha descrit una estreta relació de les cèl·lules satèl·lit i el teixit connectiu. La seva interacció és vital per una correcta regeneració i per a la remodelació de la matriu extracel·lular (ECM).^{18,19}

3. Fase de maduració de miofibres regenerants i remodelació del múscul regenerat: un microambient de qualitat és necessari per a una correcta recuperació, pel que la remodelació del teixit connectiu de la làmina basal i l'angiogènesi defineix l'últim estadi de la regeneració.

Es produeix l'activació de la ECM i la sobreproducció de molts tipus de col·lagen, fibronectina, elastina, proteoglicans i laminina que serveixen per estabilitzar el teixit i per la formació d'unions neuromusculars i miotendinoses. Això és beneficiós inicialment perquè és ràpid i dóna força i suport per recuperar-se del dany. Però si augmenta molt l'ECM, es perd la funció muscular.

El procés de reparació està complet quan la miofibra danyada recupera la seva funcionalitat i l'aparell contràctil, és a dir, està efectivament innervada.

A les dues setmanes post-dany ja comencen a veure's noves unions neuromusculars entre els axons supervivents i les fibres regenerades.

La influència neural és necessària per la última fase de maduració.^{12,14}

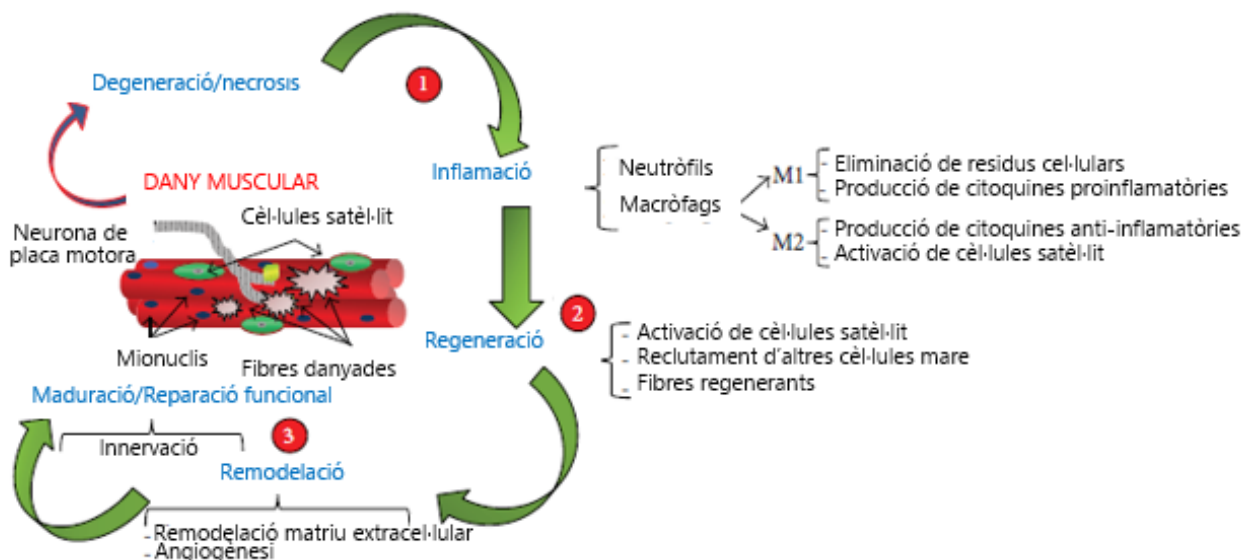


Figura 4: Regeneració muscular. Imatge extreta i adaptada de Musarò, A. et. al., 2014

1.1.5. Paper de les hormones sexuals en el múscul

El múscul esquelètic és el motor de la locomoció i juga un rol principal en el metabolisme energètic, pel que mantenir un nivell apropiat de massa muscular i la seva funció és crític per la salut i la qualitat de vida. Una disminució de la massa muscular contribueix a la morbiditat i a mortalitat en algunes malalties.

Les hormones sistèmiques, incloent les esteroidals sexuals, els factors de creixement i les citocines pro i anti-inflamatòries influeixen en la massa del teixit muscular i la seva funció. En general, els esteroides sexuals promouen el creixement i el manteniment de la massa i la força muscular i exerceixen efectes beneficiosos sobre la funció metabòlica dels músculs i la seva reparació després de les lesions.²⁰ Així, els canvis fisiològics o patològics en els nivells circulants en sang tenen implicacions importants per a la salut tant en homes com en dones. Tot i això, es produeixen:

- Diferències substancials entre els efectes dels andrògens i dels estrògens.
- Diferències dels efectes de qualsevol classe d'esteroides sexuals en mascles respecte les femelles.
- Diferències en la sensibilitat d'un tipus de múscul respecte d'un altre (o fins i tot, entre diferents cèl·lules dins del mateix múscul) als andrògens o als estrògens.

Està descrit que una disminució dels nivells circulants dels esteroides sexuals s'associa amb una disminució de la massa i la mida muscular, la força i una alteració de l'homeòstasi de la glucosa corresponent a un augment de la massa adiposa, tal i com es veu en dones post-menopàusiques, homes hipogonadals o pacients amb càncer de pròstata que reben teràpia de privació d'andrògens.²¹

Una deficiència d'estrògens (el 80% dels quals es deriva de l'aromatització de la testosterona als músculs dels mascles per mitjà de l'acció de la p450 aromatas) és responsable de l'augment del greix corporal. A més, els baixos nivells de testosterona provoquen una disminució de la massa muscular i la força en homes²², i la teràpia de reemplaçament hormonal (HRT) de testosterona és molt eficaç revertint aquests efectes. Els efectes molt potents dels andrògens sobre la massa muscular són coneguts i es mostren clarament en homes i dones que prenen esteroides anabolitzants.

S'ha descrit que els estrògens tenen efectes positius en la funció contràctil i la protecció contra el dany muscular post-exercici i la inflamació, però l'evidència dels efectes positius

en dones post-menopàusiques que reben HRT és menys convincent pels seus efectes adversos.

Tot i això, les seves accions es veuen potenciades per la càrrega mecànica, és a dir, per l'exercici.²³ S'ha descrit una atenuació de la resposta inflamatòria al dany post-exercici en dones respecte els homes, així com també una disminució de la susceptibilitat a l'estrès oxidatiu i l'apoptosi.^{24,25} També s'observa aquesta atenuació en mascles suplementats amb 17 β -Estradiol.²⁶ A més hi ha alguns estudis que postulen que l'exercici també produeix l'increment dels nivells d'Estradiol en plasma, així com els de la Testosterona.^{27,28}

1.1.5.1. Efectes dels estrògens:

Els estrògens són molècules de corticoesteroides de 18 carbonis secretats primàriament pels ovaris a dones i pels testicles a mascles. Estan involucrats primàriament en el desenvolupament i manteniment de la funció sexual i reproductiva normal però també té un ampli rang d'efectes biològics en molts teixits: cardiovascular, muscoesquelètic, immune i sistema nerviós central. L'estrogen més abundant és el 17 β -Estradiol.

Els efectes coneguts dels estrògens són:

- Atenua la inflamació i el dany, i activa la reparació a pell, teixit neural i teixit hepàtic.
- A múscul cardíac, llis i esquelètic té resultats protectors.
- A múscul esquelètic de rosegadors femelles i suplementats redueix el dany miofibril·lar i la inflamació post-dany.
- Té influència en els processos de reparació a través de l'activació i la proliferació de cèl·lules satèl·lit.

Es coneixen els efectes però no se sap ben bé per quins mecanismes ho fa.

1.1.5.2. Estrògens i dany muscular, inflamació i reparació:

A continuació es descriuen les troballes de l'efecte dels estrògens en diferents aspectes de la regeneració muscular.

- Índex de dany muscular: molts estudis en animals han demostrat que els estrògens poden atenuar alguns índex de disrupció de membrana i dany.

Un dels marcadors més comuns de disrupció de la membrana és l'aparició de la proteïna muscular creatina kinasa (CK) al corrent sanguini i els seus nivells són més alts en mascles que en femelles després d'una lesió, efecte que s'atribueix als estrògens.²⁹

Pot ser que disminueixin els nivells per l'acció dels estrògens com estabilitzadors de membrana.

També hi ha un altre marcador indirecte del dany, l'activitat de l'enzim lisosomal intramuscular β -glucuronidasa, que es troba més elevat a mascles que a femelles després de l'exercici.³⁰

- Infiltració de leucòcits i inflamació: un estudi de l'any 1999 ja reporta que les rates femelles tenen una atenuació de la infiltració de neutròfils 24 hores post-exercici i que al suplementar els mascles amb estrògens s'obté la mateixa resposta.³¹ En un altre treball publicat el mateix any, descriuen un retard en la infiltració de macròfags en les femelles respecte els mascles (del 5è al 7è dia post-exercici). També es redueix la infiltració de macròfags M1, els pro-inflamatoris, quan es produeix una suplementació estrogènica.³²

Els estrògens fan la seva funció tant per mecanismes mediatos pels seus receptors com sense ells, ja que també està demostrat que inhibeixen la inflamació i acceleren la reparació en altres teixits (fetge i teixit nerviós).

A múscul esquelètic de mamífers s'hi expressen ER α i ER β , que regulen diverses vies de senyalització intracel·lular incloent la via PI3K/Akt que estimula la síntesi proteica i el creixement muscular.³³

- Reparació muscular i regeneració. Rol de les cèl·lules satèl·lit: diversos estudis han estat adreçats a definir la relació dels estrògens en la regeneració i més concretament amb les cèl·lules satèl·lit. Un d'ells reporta que les dones tenen un increment de les cèl·lules satèl·lit més alt que els homes després de 9 setmanes post entrenament de resistència.³⁴ A més, en un estudi realitzat en ratolins mdx, van trobar que les femelles tenen menys dany, menys focus de necrosi, menys

acúmulo de col·làgen i més miofibres positives per cèl·lules satèl·lit. També troben un augment de les tres poblacions de cèl·lules satèl·lit: les quiescents (Pax7+), les activades (Pax7+ i MyoD+) i les proliferants, respecte als mascles. Aquestes diferències desapareixen en femelles ovariectomitzades o a partir de la menopausa.³⁵

Els receptors d'estrògens tenen un rol important augmentant l'activació i la proliferació de les cèl·lules mare del múscul. Bloquejar ER α elimina els efectes de l'exercici i de l'estrogen sobre les tres poblacions de cèl·lules satèl·lit.^{36,37} De fet, el ratolí *knockout* per ER α presenta una disminució de la regeneració muscular i un augment de fibres petites i de nucli central.³⁸

1.2 LES MALALTIES NEUROMUSCULARS

Els trastorns neuromusculars (NMD, de l'anglès Neuromuscular Disorders) són un grup heterogeni de malalties que afecten el múscul i/o el sistema nerviós perifèric i en les que es veu perjudicada la funció dels músculs. Com a resultat, la capacitat de realitzar moviments voluntaris es veu compromesa. Alguns NMD són adquirits però la immensa majoria són causats per defectes genètics i varien segons les seves característiques, com el patró d'herència, l'origen de la mutació genètica, la incidència, els símptomes, l'edat a l'inici, la taxa de progressió i el pronòstic. Es tracta de pacients molt complexes pel que un enfocament integrat i multidisciplinari per a la seva gestió és essencial i es precisa de la participació d'especialistes en neurologia, rehabilitació, reumatologia, immunologia, cardiologia, pneumologia...

Els NMD es poden classificar en quatre categories segons el lloc de la disfunció i les seves característiques més comunes:

- 1) Trastorns de la neurona motora: són trastorns que es caracteritzen per debilitat i atròfia muscular progressives degut a que les neurones motores del tronc encefàlic (superiors) i la medul·la espinal (inferiors) es deterioren o moren. Són trastorns heterogenis que es poden heretar i/o adquirir, i les malalties més conegudes són l'Esclerosi Lateral Amiotròfica (ALS) i l'Atròfia Muscular Espinal (SMA).

- 2) Trastorns causats per defectes primaris del múscul: en els quals el defecte genètic es troba en gens que codifiquen per proteïnes estructurals o enzimàtiques pròpies del múscul. Dins d'aquest grup les més conegudes són:
- Distròfia Muscular de Duchenne i Becker: probablement la més coneguda i de la que parlarem en el pròxim apartat de la introducció.
 - Distròfies musculars congènites (CMD): tenen una manifestació clínica des del naixement o en els primers mesos de vida i cursen amb hipotonia, debilitat dels músculs de les extremitats i el tronc. Histològicament es caracteritzen per necrosis i regeneració de les fibres i reemplaçament per teixit adipós o connectiu.
 - Distròfies musculars de cintures (LGMD): es caracteritza per afectar els músculs que es troben situats pròxims a malucs i espatlles, ocasionant debilitat dels mateixos. La malaltia té caràcter progressiu i tendeix a empitjorar amb el pas del temps, provocant disminució de volum i força muscular.
 - Miopatia distal: afectació predominant a la musculatura distal d'extremitats inferiors. Són progressives amb afectació dels músculs ascendent però amb un ritme d'evolució moderat.
 - Miopaties congènites (CM): es produeixen per un defecte en el desenvolupament del múscul, el qual produeix unes alteracions característiques a la biòpsia muscular, específiques de cadascun dels tipus de miopatia. Se solen diagnosticar poc després del naixement a l'observar que el nadó es mou poc, està dèbil i adopta posicions anormals o no s'alimenta correctament.
- 3) Trastorns de la unió neuromuscular: es produeixen per una transmissió neuromuscular deteriorada que condueix a una debilitat muscular fluctuant. La majoria són adquirits, causats per una desregulació autoimmunitària (Miastènia gravis) o amb causa genètica (Miastènia congènita). Estan caracteritzats per símptomes que apareixen generalment durant la infància, però en alguns casos poden manifestar-se a l'edat adulta o prenatal, com són la fatiga generalitzada i la debilitat muscular relativament estable i duradora, sobretot associada a l'exercici.

- 4) Trastorns del nervi perifèric: normalment poden afectar nervis sensitius i/o motors i la seva simptomatologia depèn del tipus de nervi afectat. Si es compromet un nervi motor es manifesta com a debilitat i atròfia progressiva, i si s'afecta un nervi sensitiu, es pot manifestar per alteracions de la percepció del dolor, sensibilitat... Inclouen: les neuropaties neuronals sensorials i autonòmiques (CMT, de l'anglès *Charcot-Marie-Tooth*), les neuropaties sensorials autonòmiques hereditàries (HSN, de l'anglès *Hereditary Sensory & Autonomic Neuropathy*) i les neuropaties focals hereditàries (HNA, de l'anglès *Hereditary neuralgic amyotrophy*).

Taula 2: Tipus de trastorns neuromusculars i la seva presentació clínica més comuna.

	Neurona Motora	Nervi Perifèric	Unió neuromuscular	Múscul
Malalties més conegudes	Esclerosi Lateral Amiotròfica (ALS), Atròfia Muscular Espinal (AME), Charcot-Marie Tooth...	Neuropaties neuronals sensorials i autonòmiques (CMT), Neuropaties sensorials autonòmiques hereditàries (HSN) i Neuropaties focals hereditàries .	Miastènies congènites i Miastènies gravis	Miopaties congènites, Distròfies musculars congènites, Distròfies musculars (DMD o BMD), Miopaties distals...
Presentació clínica/ diagnòstic diferencial	Paràlisi flàccida, Hipotonia, Hiporreflexia, Sensació anormal, EMG: variable, Conducció nerviosa: normal	Debilitat distal, Hipotonia, Hiporreflexia, Sensació anormal, Alteració percepció del dolor, sensibilitat... Història familiar positiva o negativa Conducció nerviosa: anormal	Debilitat progressiva, Fatigabilitat, Hipotonia, Distrés respiratori, Ptosis, EMG: normal o variable	Debilitat proximal, Hipotonia, Sensació: normal, EMG: anormal, Nivells de CKs en sang elevats, MRI de cos sencer amb patrons específics

Els majors avenços en els NMD en els últims 25 anys han estat en el desenvolupament de tècniques pel diagnòstic genètic i la identificació de molts gens mutats implicats en l'aparició de NMD. Gràcies a això, hi ha hagut una millora en la gestió de símptomes i complicacions mitjançant l'ús de fisioteràpia, ventilació nocturna, assistència i control de futures complicacions (en alguns dels NMD està associada una complicació cardíaca i fins i tot, morts sobtades). Tot això ha augmentat significativament l'esperança i la qualitat de vida dels pacients amb una malaltia neuromuscular.³⁹⁻⁴³

Els NMD són malalties amb una elevada heterogeneïtat gènica, ja que diversos gens poden estar relacionats amb un subtipus de patologia en concret, però a l'hora un mateix gen pot estar causant diverses manifestacions fenotípiques, i a més, amb un tipus d'herència molt variable. La revista "Neuromuscular Disorders" publica anualment, i té una versió en línia (<http://www.musclegenetable.org/>), una taula dels gens coneguts i els loci associats amb gens encara no identificats. A la taula 1, es presenten el número de gens descrits en l'actualitat associats a cada tipus de NMD.⁴⁴

Taula 3: Tipus de trastorns neuromusculars i número de gens associats.

TIPUS DE NMD	NUMERO DE GENS/LOCI ASSOCIATS
DISTRÒFIES MUSCULARS	45
DISTRÒFIES MUSCULARS CONGÈNITES	34
MIOPATIES CONGÈNITES	32
MIOPATIES DISTALS	16
ALTRES MIOPATIES	24
SÍNDROMES MIOTÒNICS	6
MALALTIES MUSCULARS PER CANALS IÒNICS	13
HIPERTÈRMIA MALIGNA	2
MIOPATIA METABÒLICA	28
CARDIOMIOPATIES HEREDITÀRIES	107
SÍNDROMES MIASTÈNIA CONGÈNITA	28
TRASTORN DE LA MOTONEURONA	58
ATÀXIES HEREDITÀRIES	51
NEUROPATIES HEREDITÀRIES SENSITIVOMOTORES	86
PARAPLEGIES HEREDITÀRIES	58
ALTRES NMD	34

1.2.1 Diagnòstic dels NMD

Avui en dia, el diagnòstic dels trastorns neuromusculars necessita de la combinació de una gran varietat d'especialitats. El primer pas i probablement el més important, és l'avaluació per part d'un clínic que determina la primera impressió del fenotip clínic del pacient, així com l'abast de l'afectació i un patró de debilitat muscular que el condueixi cap a un tipus de NMD específica. El següent pas és aplicar les tècniques de laboratori que permetin afegir més dades al diagnòstic, com és el cas d'avaluar un possible increment dels nivells de creatina quinasa (CKs) en sang, uns canvis específics en les

propietats del múscul i/o del nervi per mitjà de l'estudi d'electromiografia (EMG). Cada cop més, es fa servir també la ressonància magnètica de cos sencer (MRI, de l'anglès *Magnetic resonance imaging*) per establir el patró d'afectació muscular, ja que s'ha observat un patró d'afectació de determinats músculs i preservació d'altres associat a gens específics.⁴⁵ A més, extensos estudis en biòpsia muscular, incloent immunohistoquímica i immunoblot, són essencials per delinear les opcions del diagnòstic i decantar la decisió pel pròxim pas, escollir un test genètic adient que ens permeti trobar la causa de la patologia.

1.2.1.1 Diagnòstic genètic: tècniques de seqüenciació d'última generació (NGS).

Els trastorns neuromusculars presenten:

- Un elevat número de gens identificats.
- Un alt nivell d'heterogeneïtat gènica i fenotípica: molts gens associats a una patologia concreta però també diverses patologies associades al mateix gen.
- Una elevada complexitat perquè les proteïnes associades solen ser les més grans de totes les proteïnes humanes, i també, per tant, dels gens més grans del genoma.
- Un gran número de mutacions diferents, des de mutacions puntuals fins a grans delecions o rearranjaments cromosòmics. Pel que es fa necessari l'ús de moltes tècniques diferents (array-CGH, long-range PCR, MLPA, PCR i seqüenciació tradicional Sange, per exemple).

Aquestes últimes tècniques eren les úniques de les que es disposava en el passat, però es quedava un elevat percentatge de pacients sense conèixer la causa genètica, cosa que induïa a pensar en l'existència de gens encara no identificats. Gràcies a l'aparició de les tècniques de seqüenciació massiva (NGS, de l'anglès *Next Generation Sequencing*), cada any es descriuen un bon número de gens associats a NMD. Aquestes tècniques permeten una aproximació a la causa genètica molt més ràpida, senzilla i barata que la seqüenciació gen per gen.^{46,47}

Existeixen tres estratègies d'NGS a escollir:

- Panells de gens o regions d'interès: actualment és la més utilitzada i útil pel diagnòstic de NMD. Permet la seqüenciació orientada de regions o gens que poden anar des d'un fins a molts d'ells. Aquesta tècnica permet l'anàlisi dels exons

d'interès reduint molt el cost, el temps de resposta i els conflictes ètics que comporten les troballes accidentals de la resta d'estratègies. Existeixen panells d'un sol gen (com per la seqüenciació del gen *dmd*, causant de la Distròfia Muscular de Duchenne), panells mitjans (amb tots els gens associats a un fenotip en particular, de 12 a 56 gens) i panells més extensos (en els que s'inclouen tots els gens rellevants per NMD més els gens amb alt potencial de ser candidats o fins i tot, tots els gens descrits associats a una malaltia mendeliana).

- Seqüenciació de tot l'exoma (WES, de l'anglès *Whole Exome Sequencing*): és la seqüenciació de tots els exons dels gens, el que correspon al 2% del genoma. És l'estratègia més utilitzada per a la recerca ja que permet el descobriment de nous gens però a l'hora permet fer un anàlisi pels gens candidats i poder diagnosticar així als pacients. El rendiment d'aquest test ha millorat moltíssim però la cobertura mitja segueix sent més baixa que amb els panells i els costos són majors. Realitzar la tècnica en el trio (el proband afecte i els dos progenitors) augmenta molt la taxa de detecció i la precisió.
- Seqüenciació de tot el genoma (WGS, de l'anglès *Whole Genome Sequencing*): és la seqüenciació de tot el genoma humà. Acabarà sent la prova genètica única i completa perquè tens tota la informació disponible provinent del genoma. Té una cobertura més homogènia i permet la detecció de reordenaments estructurals ja que la preparació de les mostres no està predisposada per les diferències en la captura, i els artefactes degut a la PCR es poden evitar amb protocols lliures de PCR. Encara no s'utilitza pel diagnòstic per l'elevat cost i per les dificultats en la interpretació de les troballes.

En aquest dos últims casos s'ha d'establir unes bases ètiques que ens permetin decidir què fer amb les troballes accidentals que no tenen res a veure amb el fenotip d'estudi. Escollir bé una d'aquestes estratègies ens assegurarà una possibilitat d'èxit en el diagnòstic, més alta.^{39,48}

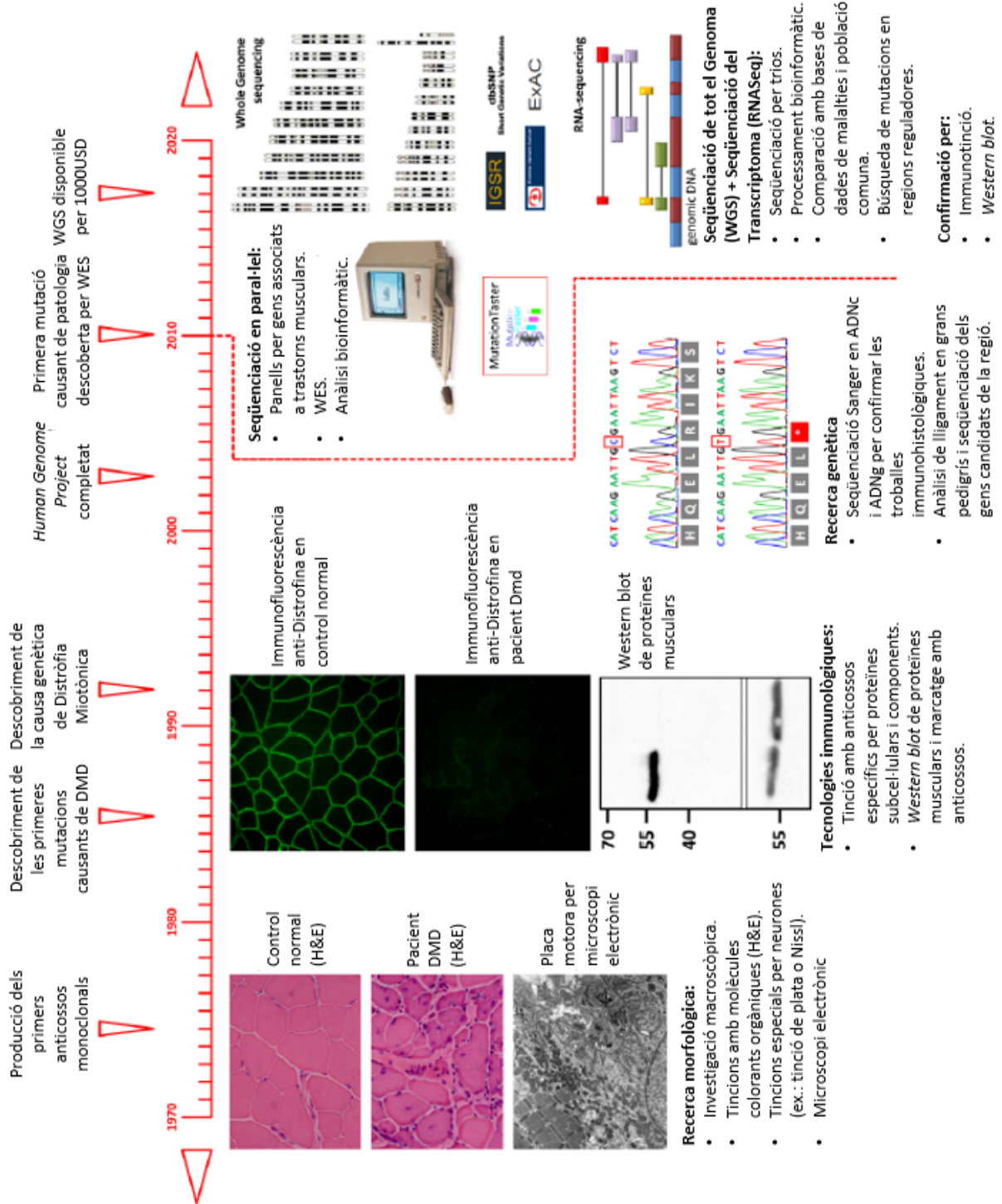


Figura 5: Aspectes bàsics i evolució del diagnòstic dels trastorns neuromusculars. Extreta i adaptada de Schuelke, M. 2016.

1.3 LA DISTRÒFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

La Distròfia Muscular de Duchenne (DMD) és una malaltia neuromuscular lligada al cromosoma X i la distròfia muscular més comuna entre els nens, amb una incidència d'un entre 3.600-6.000 dels nens nascuts.⁴⁹ Va ser descrita per Guillaume Benjamin Duchenne el 1861.

La causa de la patologia és una mutació al gen *dmd*, el qual codifica per la proteïna distrofina. Com a resultat es produeix una disrupció de la pauta de lectura i una absència de distrofina. Si la mutació no altera la pauta de lectura, hi ha una distròfia només parcial i un fenotip més lleu, el que es coneix com a Distròfia Muscular de Becker (BMD).^{50,51}

1.3.1. Aspectes clínics

Els símptomes típics de la malaltia apareixen entre els 2 i els 5 anys d'edat i es presenten en forma de retràs en el desenvolupament motor del nen, debilitat muscular que comença per la zona proximal de les extremitats inferiors i dificultat per la deglució. Solen caure força sovint i els hi costa molt aixecar-se del terra. També poden presentar problemes cognitius lleus, especialment en el llenguatge, però la discapacitat intel·lectual és estàtica i no correlaciona amb la debilitat de cada nen. En alguns casos, la discapacitat cognitiva pot ser més evident.

El curs de la malaltia és previsible, tot i les possibles diferències individuals. Durant els dos primers anys de vida, els nens pateixen un retard en les funcions motores, un increment important dels nivells de CK en sèrum i un augment associat de les transaminases. Després les manifestacions clíniques van apareixen però encara van assolint habilitats i millorant la funció motora fins als 6-7 anys, quan es produeix una fase d'estabilització d'1 a 2 anys. A partir de llavors, la debilitat és progressiva i és més evident la degeneració, provocant que els afectats perdin la capacitat de caminar cap als 12 anys (o una mica més tard si segueixen el tractament amb glucocorticoides) i hagin d'utilitzar una cadira de rodes. Durant el progrés de la malaltia també apareixen complicacions cardíaques i molt sovint, entre la vintena i la trentena d'edat, els afectats moren. La major causa de mortalitat és una insuficiència respiratòria crònica perquè en aquest període, la capacitat vital forçada disminueix, el diafragma es debilita i la capacitat toràcica es veu reduïda.⁵²⁻⁵⁵

1.3.2 Distrofina

El gen de la distrofina es troba situat al braç curt del cromosoma X (Xp21.1), és el gen més gran de tots els que s'han identificat fins al moment i presenta 79 exons. L'ARNm transcrit està expressat predominantment en tot múscul llis, esquelètic i cardíac i, en menor mesura, en el cervell.⁵⁶

Aquest gen codifica per la distrofina, una proteïna de 427 KDa composta per 3.685 aminoàcids i que compta amb 4 dominis estructurals importants (figura 6):

- El domini NH₂-terminal d'unió a l'actina: s'uneix directament a l'actina del citoesquelet. És així com la distrofina es connecta a la xarxa d'actina subsarcolèmica.
- Domini central: conté 24 repeticions d'espectrina que adopten una conformació de triple hèlix, proveint a la proteïna d'una estructura de vareta flexible. Aquest domini interacciona amb un elevat nombre de proteïnes, com el filaments intermedis, els microtúbuls i fosfolípids de membrana entre d'altres.
- Domini ric en cisteïna: esta compost d'un domini WW, dos motius *EF-hands* i un domini ZZ. Permet la unió de distrofina amb β -distroglicans, plectines, anquirines i sinemines.
- El domini COOH-terminal: és el lloc d'unió per la sintrofina i la distrobrevina.⁵⁷

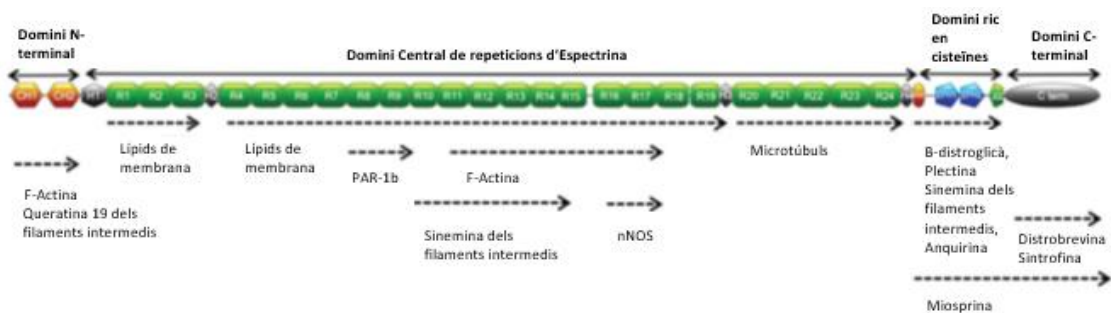


Figura 6: Principals dominis i llocs d'unió de la distrofina. Extreta i adaptada de Le Rumeur, E. et. al, 2015.

Tot i que aquesta és la proteïna convencional, existeixen varies isoformes (figura 7) degut a la presència de varis promotors alternatius.



Figura 7: Isoformes i promotors alternatius del gen de la distrofina. Cadascuna d'aquestes isoformes té una expressió específica, havent 3 promotors específics per la forma completa (de 427kDa) expressant-se a cervell, múscul i cèl·lules de Purkinje. Les isoformes més petites són: Dp260 (a retina), Dp140 (a cervell), Dp116 (a Cèl·lules d'Schwann) Dp71 (amb una expressió més ubíqua) i del mateix promotor sorgeix Dp40 (amb expressió exclusiva a cervell).
Extreta de McGreevy, J., et. al., 2015.

El complex associat a la distrofina (DPC, de l'anglès *Dystrophin-associated complex*) està compost per la distrofina i totes les proteïnes que s'hi associen. Els components d'aquest complex poden ser dividits en tres grups depenent de la seva localització a la cèl·lula: extracel·lulars, transmembranals i citoplasmàtics (figura 8).

Es creu que al teixit muscular el DPC té la funció d'estabilitzar el sarcolemma per mitjà de la unió del citoesquelet amb la làmina basal. A més a més, s'ha descobert que el DPC també es troba implicat en vies de senyalització, és necessari pels neurotransmissors i ajuda a mantenir l'homeòstasi del calci.^{58,59}

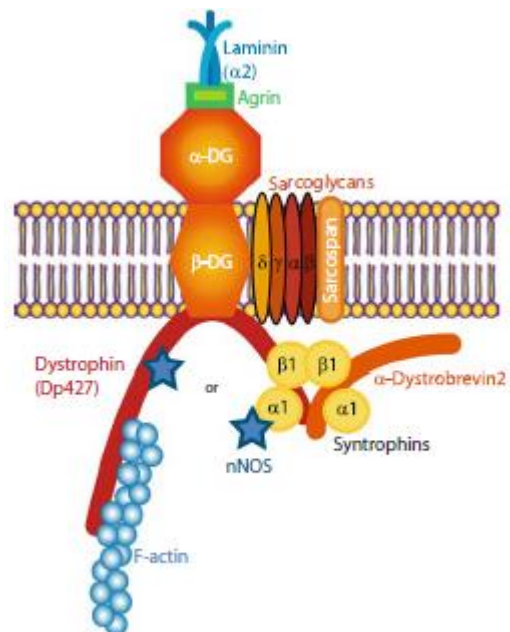


Figura 8: Complex de proteïnes associades a la distrofina (DPC). Està format per una part extracel·lular composta per l'α-distroglicà (αDG), les proteïnes β-distroglicà, sarcoglicans (α,β, γ i δ) i el sarcospan donen lloc al domini transmembrana; i a més, el DPC pot unir a la seva part citoplasmàtica quatre sintrofines (α1 i/o β1) que a la seva vegada recluta molècules com nNOS o α-Distrobrevina. A totes elles s'uneix la distrofina.
Imatge extreta de Pilgram, G.S.K., et. al. 2009.

Existeix una proteïna similar a la distrofina, anomenada utrofina. La seva massa molecular és de 395kDa i està codificada per un gen localitzat al cromosoma 6 en els humans i en el 10, en els ratolins. Probablement, la utrofina i la distrofina són paràlogs que van ser creats gràcies a una duplicació a principis de l'evolució dels vertebrats, i tenen una identitat del 80%. La principal diferència entre la distrofina i la utrofina és que la utrofina està més extensament expressada en els teixits d'un adult sa. S'expressa a múscul llis, esquelètic i cardíac però també a endotelis vasculars, cèl·lules gials de la retina, plaquetes... En múscul d'adult sa, aquesta proteïna es localitza a les crestes de

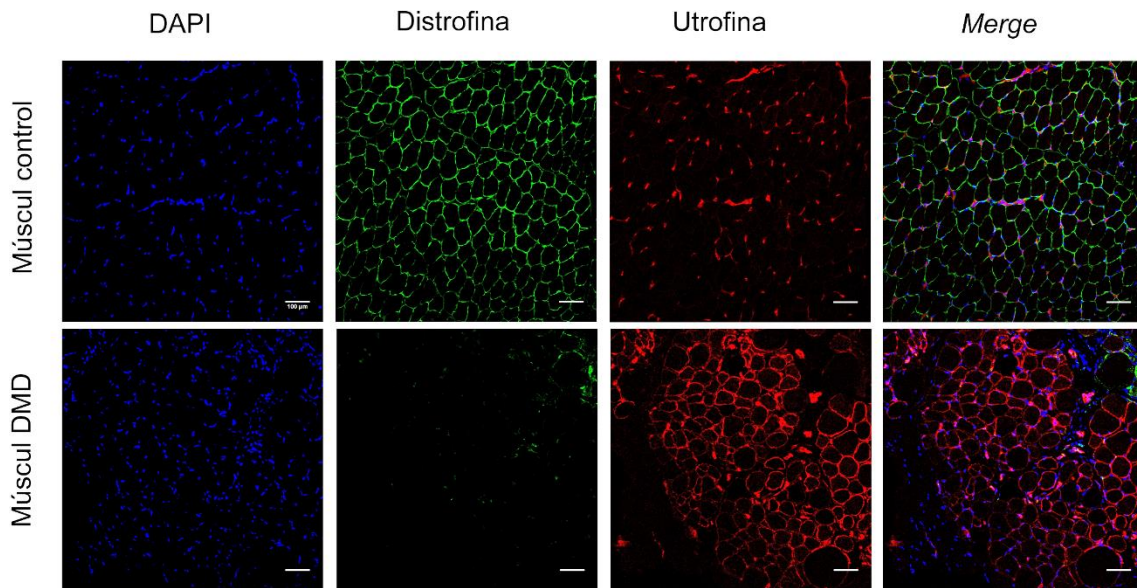


Figura 9: Expressió d'utrofina en múscul sa i distròfic. Immunohistofluorescència per visualitzar distrofina i utrofina en múscul humà extret de controls sans i en múscul de pacient amb Distròfia Muscular de Duchenne.

les unions neuromusculars i miotendinoses, però durant el desenvolupament, després d'una lesió i en alguns trastorns neuromusculars, es troba al llarg del sarcolemma. També es troba compensant la falta de distrofina.⁶⁰

1.3.3 Canvis en absència de distrofina

En músculs en condicions normals, el citoesquelet d'actina de la membrana s'acobla al sarcolemma a través de la distrofina i el complex DPC. Quan hi ha absència de distrofina, com en els DMD, el sarcolemma és menys estable, es produeix una disrupció i s'incrementa la permeabilitat de la membrana.⁶¹ A més, l'expressió d'altres proteïnes del DPC també es redueix en els músculs deficientes en distrofina perquè la presència de la distrofina és necessària per l'estabilitat del complex, empitjorant així l'alteració de

la membrana. En particular, els nivells de mRNA i proteïna de l'enzim nNOS es redueix a un 80%.⁶²

Degut a aquesta disrupció de la membrana i l'increment de la seva permeabilitat, els enzims com les CKs es filtren des de la cèl·lula, fent que els nivells en sang siguin alts. La CK és un enzim que catalitza la transformació de creatina a fosfocreatina, i es troba predominantment al múscul esquelètic. Per això, la detecció d'alts nivells de CK a la sang és un marcador de dany muscular i de distròfies musculars com DMD, en què els nivells poden arribar a 50 a 100 vegades el nivell normal.⁵⁰

Un altre esdeveniment patològic observat en l'absència de distrofina és l'increment de la concentració d'ions calci intracel·lular ($[Ca^{2+}]_i$). És un succés primerenc que condueix a la proteòlisi per mitjà de l'activació de calpaines i més tard, a apoptosi i necrosi. El procés pel qual el $[Ca^{2+}]_i$ incrementa encara no està clar però sembla que involucra fluxos de calci trans-sarcolèmics. Els canals TRP són un tipus de canals de Ca^{2+} mecanosensibles independents del voltatge, els quals presenten una sobreexpressió en les fibres de múscul distròfic, incrementant l'influx de Ca^{2+} cap a l'interior de la cèl·lula. A més d'aquests canals, Orai1 i STIM1 també veuen incrementada la seva expressió i els canals sarcolèmics NCX reverteixen el seu influx.⁶³

A més del flux de Ca^{2+} des de l'exterior, s'han observat alteracions en els transportadors del reticle sarcoplasmàtic. Ryr1 és un canal que treu Ca^{2+} del RS i que pot patir una elevada S-nitrosilació als residus de cisteïnes, causant una depleció de la seva unitat estabilitzadora, la calstabin1. Aquestes dues alteracions duen a un error de funcionament de Ryr1 fent que alliberi Ca^{2+} al citosol, contribuint a l'augment. L'altre transportador de calci al RS és SERCA, un transportador dependent d'ATP que entra els ions al lumen del RS. El SERCA té dues isoformes al múscul esquelètic adult, SERCA1a i SERCA1b, i són diferencialment expressats dependent del tipus de fibra muscular. En múscul distròfic, hi ha una reducció de l'activitat dels SERCA, amb el que menys Ca^{2+} entra al lumen del RS.

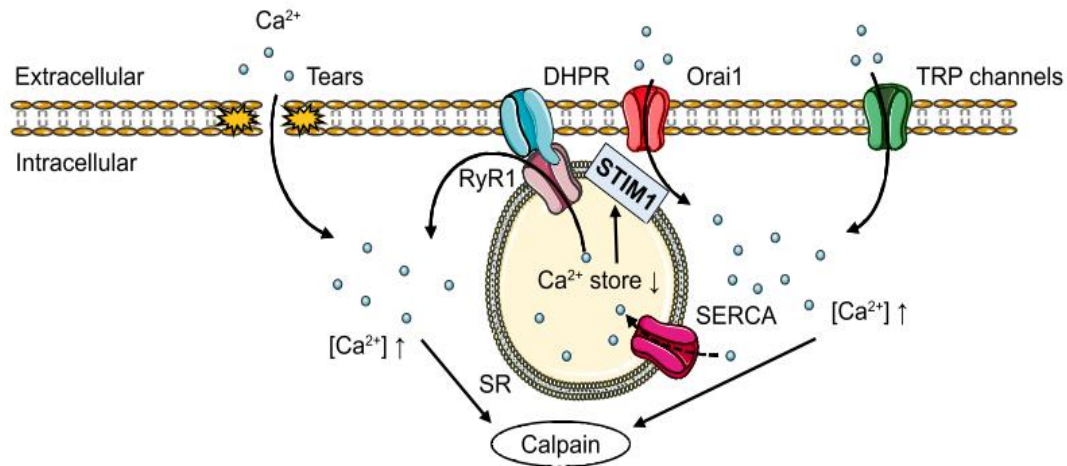


Figura 10: Vies involucrades en l'homeòstasi del calci al múscul esquelètic i que estan alterades en DMD.

Hi ha 4 fenòmens pels quals augmenta el $[Ca^{2+}]_i$: (1) Per la disrupció de la membrana el Ca^{2+} entra directament a la cèl·lula. (2) Es produeix una sobreactivació de RyR1, que produeix un alliberament de Ca^{2+} des del SR al citoplasma. (3) La translocació d'ORAI1 a prop de la membrana plasmàtica, activa Orai1 que permet un flux de Ca^{2+} cap a dins del citosol. (4) Sobreexpressió dels canals TRP de la membrana a DMD, incrementant el $[Ca^{2+}]_i$. **Imatge extreta de Miyatake, S., et al., 2016.**

Tots aquests fenòmens incrementen la $[Ca^{2+}]_i$, causant una activació de les proteases activables per calci, les calpaines. Molts estudis han demostrat un increment de l'activitat d'aquests enzims a les fibres distròfiques i que l'expressió de l'inhibidor endogen de les calpaines, la calpastatina, millora alguns trets del DMD. Quan les calpaines s'activen, es produeix una ràpida proteòlisi que duu a l'apoptosi i la necrosi de les fibres. A més, la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) també contribueix a la mort cel·lular.⁶⁴

Els músculs dels pacients amb DMD també tenen la capacitat de regenerar post-lesió però presenten un deteriorament de la regeneració muscular⁵⁹. Com a conseqüència d'aquesta regeneració alterada, les miofibres pateixen cicles de necrosi-regeneració fins que es depleciona la capacitat regenerativa del múscul, i la massa muscular es veu reemplaçada per teixit connectiu i adipós. Aquest procés s'anomena fibrosi i consisteix en la deposició aberrant de components de la matriu extracel·lular (ECM).⁶⁵ En DMD, quan això passa, s'altera la funció del múscul i hi ha menys múscul disponible per a potencials tractaments.



Figura 11: Conseqüències de l'absència de Distrofina en el múscul de pacients amb Distròfia Muscular de Duchenne.

1.3.4 Models experimentals de DMD

Tenir models animals de les malalties a estudiar és bàsic per entendre la fisiopatologia i provar noves teràpies. Pel que per la Distròfia Muscular de Duchenne existeixen un gran nombre de models experimentals, es creu que més de 60, que van des de organismes cel·lulars fins a primats no-humans.^{66,67}

1.3.4.1 Models de cèl·lules mare

Encara que les cèl·lules mare embrionàries i les iPSCs amb mutacions a dmd han estat utilitzades per estudiar la patologia del múscul esquelètic i cardíac i l'eficàcia dels fàrmacs, el focus s'ha centrat en crear el model per la cardiomiopatia. S'ha observat que els cardiomiocits derivats d'iPSCs proveeixen una alternativa millor al ratolí mdx ja que aquest desenvolupa una malaltia més lleu, i més tard en la seva vida. A més el cor dels ratolins divergeix fisiològicament del cor humà.

Utilitzar cèl·lules mare és una eina molt més accessible per testar tots els fàrmacs i sobretot, de cara a la teràpia gènica ja que poden ser alterades utilitzant CRISPR/Cas9 modificant així la mutació. Això proporciona un control isogènic en el qual l'única diferència entre les 2 poblacions cel·lulars és la seqüència genètica corregida.⁶⁸

1.3.4.2 Models animals no-mamífers

El gen *dmd* és un element altament conservat durant l'evolució i que presenta homòlegs a vertebrats i invertebrats. Tot i que els invertebrats presenten una musculatura i una manifestació de la patologia diferent, el seu ús en experimentació té avantatges com la seva simplicitat o que són fàcils de manipular genèticament.⁶⁹ Hi ha tres models més comuns:

- a) El peix zebra (*Danio rerio*) que té un desenvolupament ràpid i els seus embrions són translúcids en la seva capa externa, pel que es veu fàcilment la manipulació que s'hi realitzi. Tenen moltes proteïnes del complex DPC i la seva localització de membrana és la mateixa que als humans, cosa que els fa més aptes per l'estudi. Un peix zebra deficient en distrofina creat per eliminació del gen presenta una extensa degeneració i necrosis muscular, fibrosis, inflamació, activació de les cèl·lules satèl·lit i variació del diàmetre de les fibres. Actualment s'utilitzen per les teràpies d'*exon-skipping* i demostren que es necessiten nivells del 20-30% per recuperar el fenotip.^{69,70}
- b) Els nematodes *Caenorhabditis elegans* tenen els avantatges de que són genèticament molt manipulables i creixen i es reproduïxen massivament i fàcilment. Expressen un homòleg de la distrofina, *Dys1* i si se li afegeix el gen *MyoD* mutat es pot observar un deteriorament de la locomoció. Els nematodes afectes tenen una degeneració generalitzada dels músculs de la paret corporal, però la seva estructura és dramàticament diferent de la dels mamífers ja que les seves fibres no es fusionen i són incapaces de regenerar. S'han utilitzat per provar molts compostos, com la Prednisona que aconsegueix reduir el número de fibres degeneratives un 40%.^{69,71}
- c) El model de *Drosophila melanogaster* és útil perquè es genera en poc temps i té molta progènie cada cop que es reproduïx, presenta una morfologia simple i té el pla del cos segmentat. També presenta la majoria dels components del complex DPC, pel que resulta útil per veure i estudiar la degeneració ja que al no tenir cèl·lules satèl·lit, no regeneren.^{69,72}

1.3.4.3 Models de rosegadors

- a) Models de ratolí: el model murí ha estat amb diferència el més utilitzat per l'estudi de la DMD. Existeixen diverses soques de ratolins amb mutacions al gen de la distrofina, de les quals la més estudiada i utilitzada és el ratolí amb Distrofia Muscular lligada a l'X (*mdx*).

Va ser descobert per casualitat l'any 1984 per investigadors que buscaven mutants pels enzims de la glicòlisi. Van trobar un mutant de la soca C57BL/10 ScSn que presentava alts nivells plasmàtics de CK muscular i amb un estudi més detallat es van adonar que semblava tenir una distròfia muscular amb un patró d'herència lligada al cromosoma X. Aquests ratolins presenten, de forma espontània, una mutació que crea un codó stop a l'exó 23 del gen, la qual comporta una manca total de distrofina muscular.⁷³ Igual que en els pacients amb DMD, els ratolins *mdx* presenten lesions musculars i necrosi, i uns nivells plasmàtics de CK força elevats. Malgrat les similituds genètiques, histològiques i bioquímiques entre el ratolí *mdx* i els pacients amb DMD, la clínica de la malaltia és menys severa en l'*mdx* que en l'humà. A diferència dels humans, el ratolí *mdx* té una esperança de vida gairebé igual que un ratolí de la soca C57BL/10 ScSn, només disminueix un 25%, i presenta una debilitat muscular lleu. La patologia muscular de la malaltia és pràcticament absent durant els primers 15 dies de vida i la necrosi s'activa i està en el seu punt màxim entre la tercera i la vuitena setmana de vida.⁶⁹ A partir d'aquesta edat no tots els autors estan d'acord amb el que succeeix al múscul, alguns postulen que la necrosi desapareix i d'altres, que la necrosi no desapareix sinó que es manté en uns nivells més baixos.

Alguns autors han suggerit que les diferències en el curs de la malaltia entre el ratolí i l'humà són degudes a que el ratolí presenta una capacitat regenerativa major, però posteriorment en alguns estudis s'ha posat en dubte aquesta hipòtesi. A més, existeix una heterogeneïtat respecte a l'afectació patològica entre els diferents músculs, s'ha vist que alguns músculs no pateixen gairebé necrosi i, en canvi, d'altres (com el diafragma) tenen una patologia més greu.

És per això que en molts estudis s'utilitza l'exercici com a mecanisme de potenciació de la patologia, augmentant el dany muscular i els cicles de necrosi-

regeneració, a fi de fer més evident les diferències fenotípiques del ratolí distròfic. A l'hora, la realització de diferents tests funcionals ens permet avaluar el rendiment dels animals al llarg del testeig de possibles tractaments.^{74,75}

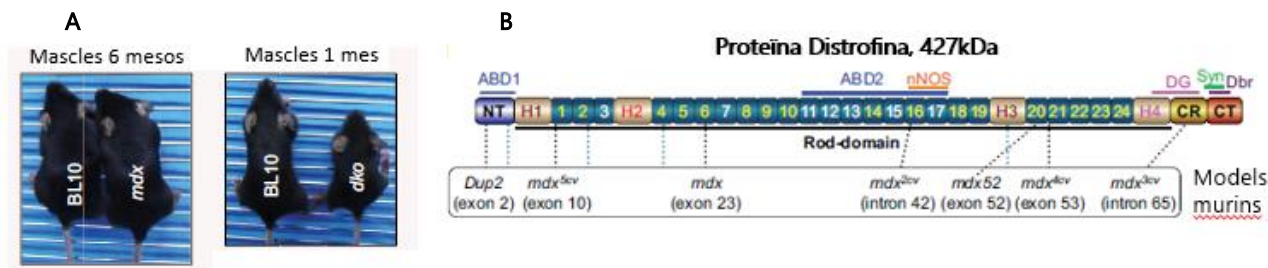


Figura 12: (A) Diferències entre els ratolins de la soca C57BL/10 ScSn, els *mdx* (cap diferència fenotípica) i els doble *knockout* *dko* (molt més petits i amb esperança de vida molt més curta). (B) Dominis de la proteïna Distrofina i posicions de les mutacions de les soques conegudes de ratolins. **Imatge extreta i adaptada de McGreevy, J., et. al., 2015.**

També s'ha descrit que l'estabilitat del múscul en el ratolí *mdx* és atribuïble a un increment de l'expressió de la utrofina. En el ratolí *mdx* sovint es detecta utrofina a les membranes de fibres regeneratives. Aquest possible paper de la utrofina afavorint un curs més lleu de la malaltia del ratolí *mdx* ve recolzat pels resultats obtinguts en el creuament del ratolí *knockout* d'utrofina amb el ratolí *mdx* (*mdx/utr^{-/-}*), en el que s'observa una patologia més greu i semblant a la DMD i una reducció dràstica de l'esperança de vida.^{60,76,77} Tot i això, els ratolins de la soca *mdx/utr^{-/-}* són difícils i costosos de mantenir i per això s'investiga principalment amb la soca *mdx*.

També existeixen altres soques *mdx* amb mutacions a altres posicions del gen o amb ratolins *knockout* per altres gens. Però segones mutacions introduïdes per reduir els mecanismes compensatoris, humanitzar els ratolins, reduir la regeneració muscular i mutar gens involucrats al citoesquelet de la matriu extracel·lular els fa diferents al que tenen els pacients amb DMD i fa més difícil la interpretació de la patologia.⁷⁸

El ratolí *mdx* és el model murí més utilitzat i és útil per l'estudi de la patogènesi i les seves modificacions però no per veure la resposta a vectors virals de teràpia gènica.^{66,67}

b) Models de rata: hi ha dues soques de rates amb fenotip distròfic, una d'elles presenta delecions de l'exó 3 i 16 o a l'exó 23 que els hi causen nivells indetectables de distrofina. El model amb delecio de l'exó 23 mostra una mionecrosi i una regeneració progressiva amb reemplaçament de teixit fibròtic i adipós.

Són un bon model per l'estudi de la cardiomiopatia a DMD ja que presenten una fibrosi significativa al cor i desenvolupen una cardiomiopatia dilatada.⁷⁹

1.3.4.4 Grans animals com a model de DMD

S'han establert models en gats, gossos i porcs, però també s'ha realitzat la disrupció del gen al mico (*Rhesus monkey*), tot i que no s'ha aconseguit establir-lo com a model. Són útils per l'estudi de vectors virals, per exemple, els models canins tenen un fort rebuig immune després de la teràpia gènica, igual que els humans.

Tot i que alguns d'aquests models repliquen més de prop la malaltia humana que els no-mamífers o els rosegadors, són també més costosos de mantenir i la seva disponibilitat per la recerca és limitada.^{66,67}

a) Models canins: s'han descrit diversos models canins de DMD, els més coneguts i utilitzats de tots són:

- El model de Golden Retriever amb Distròfia muscular (*GRMD*): presenten de forma natural una mutació puntual al lloc acceptor d'splicing de l'intró 6 (lloc comú de mutació a humans) que fa que es produeixi l'splicing de l'exó 7 i aparegui un codó stop prematur a l'exó 8. Degut a això no hi ha síntesi de proteïna. Aquest model presenta una similitud important en quant a les característiques pròpies de la DMD (CKs elevades, degeneració muscular i augment de la fibrosi...). Tenen un curs de la malaltia semblant, acaben morint als 3 anys però presenten un període d'estabilització sobre els 6 fins als 10 mesos cosa que difereix als humans. També presenten fenotips variables degut a la presència de modificadors genètics.
- El model de Distròfia muscular canina lligada al X (*CXMD*): va aparèixer com a alternativa als alts costos que implicava mantenir els *GRMD*. Al 2003⁸⁰, van crear la soca degut a que el gos de la raça Cavalier King Charles Spaniel (CKCS)

amb mutació a l'exó 50 apareguda de forma natural presentava molts problemes de cria. Ho van fer a partir de la inseminació artificial de femelles de la raça Beagle amb espermatozous congelats provinents de *GRMD* i amb el posterior creuament amb mascles Beagle.⁶⁷

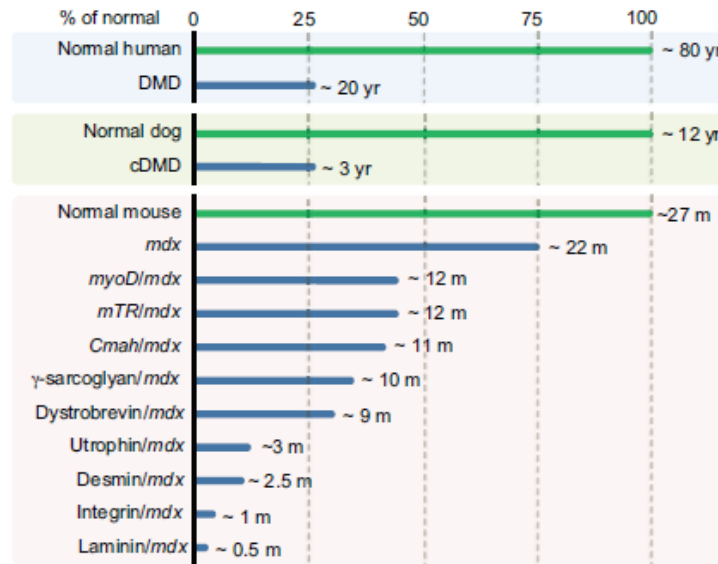


Figura 13: Comparació de l'esperança de vida entre els humans, els gossos i diversos models murins afectats per la patologia. Extreta de McGreevy, J., et. al., 2015.

- b) Models felins: en el gat distròfic es produeix per una gran deleció dels promotors de la distrofina a múscul i a les fibres de Purkinje. La patologia en aquests gats va ser anomenada com Distròfia Muscular Hipertròfica Felina (HFMD) degut a que presenten un fenotip únic, que es caracteritza per una hipertròfia de músculs linguals, del coll i l'espatlla, així com una dipòsit de calci als músculs en lloc de l'aparició de fibrosis. Tot això fa que aquest model no sigui útil per la poca similitud amb la patologia de la DMD.^{66,67}
- c) Models porcins: els porcs deficientes en distrofina han estat generats per deleció de l'exó 52 i presenten semblances amb l'humà pel que fa a mionecrosis multifocals progressives i regeneració, fibrosi intersticial i infiltració de cèl·lules mononuclears. Per contra, presenten un deteriorament funcional accelerat. Tot i això, s'utilitzen per estudis d'*exon-skipping*, canvis proteòmics durant els diferents estadis de la patologia. Tenen un gran inconvenient i és que viuen màxim 14 setmanes pel que no arriben a reproduir-se i criar.⁸¹

1.3.5 Tractaments actuals i noves teràpies

Avui en dia, no hi ha tractament curatiu per DMD i l'únic medicament que s'ha demostrat per millorar la funció muscular i la força són els glucocorticoides, però segueixen sent pal·liatius. Encara que el seu mecanisme d'acció així com les seves dosis òptimes no estan clars, aquest tractament pot comportar una prolongació de l'ambulació de 1 a 3 anys, també elimina l'escoliosi i retarda la insuficiència respiratòria i la disfunció cardíaca. El principal problema d'aquesta teràpia són els elevats efectes secundaris a llarg termini, com l'augment de pes, els trastorns endocrins, l'osteoporosi i les alteracions conductuals.⁴⁹

Per aquestes raons, la recerca d'un tractament més adequat per a pacients amb DMD és un camp de recerca àmpliament actiu, per la qual cosa des de fa anys s'estan desenvolupant diferents teràpies amb l'objectiu de restaurar l'expressió de distrofina o per trobar mecanismes que permetin trobar una cura.⁸²⁻⁸⁷

1.3.5.1 Teràpies gèniques

L'objectiu principal de la teràpia gènica de DMD és millorar la patologia muscular i millorar la funció muscular convertint així el fenotip DMD al fenotip més lleu, BMD (figura 14). A més, també pot prevenir o frenar el desenvolupament de la malaltia muscular si els individus afectats són tractats amb la suficient antelació.

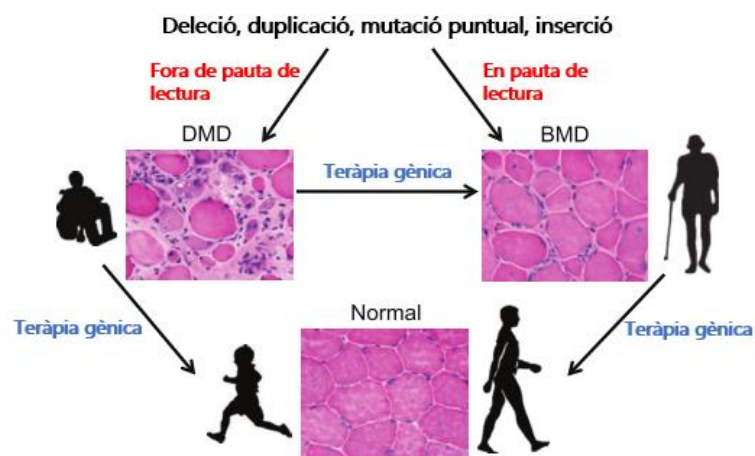


Figura 14: Objectiu bàsic de la teràpia gènica. Extreta de McGreevy, J., et. al., 2015.

a) Teràpies de mutació específica:

Aproximadament el 10% de mutacions al gen *dmd* que presenten els pacients són mutacions puntuals que afecten a una sola base i que introdueixen codons STOP prematurs (PTC, de l'anglès Premature Termination Codon) a l'ARNm de la distrofina.⁸⁸ Aquestes mutacions duen a una senyal de terminació durant la traducció a proteïna que resulta en un producte més curt, no funcional i normalment inestable que és degradat per la cèl·lula. L'estratègia terapèutica que es persegueix des de fa temps és la supressió d'aquestes mutacions.

Alguns antibiòtics com la gentamicina o la geneticina (aminoglicòsids) a dosis elevades poden induir la traducció directa ignorant la senyal de terminació prematura, afegint un aminoàcid en aquella posició i donant lloc a una proteïna que pot tenir igual o menys funcionalitat. Això és el que es coneix com a efecte *read-through*. L'eficàcia d'aquest enfoc va ser demostrada per primera vegada en ratolins mdx utilitzant injeccions subcutànies de gentamicina.⁸⁹ Tanmateix, les toxicitats greus que limiten la dosi impedeixen l'ús de gentamicina en pacients. A més d'aquests dos compostos àmpliament utilitzats també s'han provat altres

compostos aminoglicòsids i no aminoglicòsids (figura 15), que han estat testats amb resultats diversos, com: amikacina, anàlegs de la kanamicina B, zidovudina, adefovir, cisplatino, RTC13 i RTC14, i derivats, NB54 i NB84.^{90,91}

Small molecule	Molecular target	Readthrough tests	Clinical use		
			For antibacterial action	In clinical trial for stop diseases	
Aminoglycosides	Amikacin		YES	NO	
	G418 (geneticin)		NO	NO	
	Gentamicin	Ribosome SUBUNIT 40S rRNA 18S HELIX 44	<i>In vivo</i> (mouse)	YES	YES
	Paromomycin		Cell line	Only for intestinal parasite	NO
Aminoglycoside derivatives	NB54		NO	NO	
	NB74	Ribosome SUBUNIT 40S rRNA 18S HELIX 44	Cell line	NO	NO
	NB84		<i>In vivo</i> (mouse)	NO	NO
	TC007		<i>In vivo</i> (mouse)	NO	NO
Non aminoglycosides	Negamycin	Ribosome SUBUNIT 40S rRNA 18S HELIX 44	<i>In vivo</i> (mouse)	NO	NO
	Tylosin	Ribosome SUBUNIT 60S rRNA 23S POLYPEPTIDE EXIT CHANNEL	Cell line	Only in veterinary medicine	NO
	PTC124* (Ataluren)	nd	<i>In vivo</i> (mouse)	NO	YES (phase III)
	RTC 13	nd	<i>In vivo</i> (mouse)	NO	NO
	RTC 14		<i>In vivo</i> (mouse)	NO	NO

Figura 15: Fàrmacs coneguts amb capacitat *read-through*. Imatge extreta de Biddou, L., et. al., 2012.

Els programes de detecció de fàrmacs van conduir a la identificació de PTC124 (o també conegut com a Ataluren), un compost que es preveia més potent que la gentamicina com a possible tractament. El PTC124 no compta amb la toxicitat dels aminoglicòsids i ha estat suggerit com a tractament potencial de les mutacions *nonsense*, sobretot les que presenten un codó UGA prematur. Tot i que no se sap ben bé el seu mecanisme⁹², Ataluren va resultar efectiu en la restauració de distrofina en ratolins mdx, resultant en una millora de la força i una disminució de la lesió en resposta al dany⁹³. L'estudi es va realitzar amb marcatge amb luciferasa i posteriorment s'ha demostrat l'habilitat del PTC124 per potenciar la luciferasa sense fer acció *read-through*.⁹⁴ Pel que tot això, més altres estudis recents realitzats *in vitro* han posat en qüestió la veritable capacitat de l'Ataluren per realitzar aquesta funció.

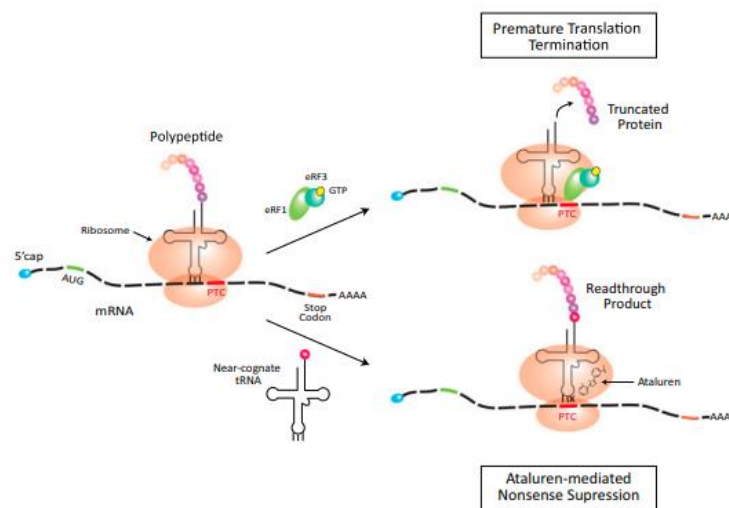


Figura 16: Diagrama esquemàtic que il·lustra el mecanisme d'acció proposat per l'Ataluren. Es creu que interactua amb el ribosoma i facilita el reclutament de *tRNAs* pròxims, suprimint la mutació sense sentit i permetent el *read-through* del PTC i la síntesi d'una proteïna completa. **Imatge extreta de Siddiqi, N., et. al., 2018.**

Per la falta de possibles tractaments i uns resultats preliminars prometedors, Ataluren va entrar en assaig clínic. Durant la fase I es van establir les dosis segures i tolerables en voluntaris sans, i durant la fase IIb es van estudiar pacients DMD i BMD d'entre 5 i 20 anys durant 48 setmanes. Es va concloure una milloria significativa d'aproximadament 29 metres en el test de caminar 6 minuts (6MWT, de l'anglès *6-minute walking test*) amb la dosi més baixa administrada, a 40mg/kg, però no amb la més alta (80mg/kg). Recentment, amb la fase III de

l'assaig fent l'estudi amb dosi de 40mg/kg, doble cec amb grup placebo i ataluren no es van trobar diferències entre els dos grups pel que fa al 6MWT. Però els investigadors de l'assaig matisen que es va registrar un efecte significatiu de l'Ataluren en el subgrup específic de pacients amb una línia de base de 6MWT de 300m o més però menys de 400m, cosa que apunta que pot ajudar a determinar els pròxims grups d'estudi.⁹⁵ A causa dels resultats controvertits, que no van proporcionar proves substancials de l'eficàcia del PTC124, obtingudes en les Fases IIb i III dels assaigs de DMD, la FDA va eliminar el medicament del mercat a principis de 2016. Per contra, dos mesos després, el NICE estava aprovant el seu ús al Regne Unit. Tot això planteja dubtes de quin és el mecanisme d'acció i si realment aquest compost té eficàcia terapèutica.^{82,87}

La majoria de pacients amb DMD duen delecions o duplicacions parcials del gen de la distrofina o mutacions que poden afectar l'*splicing* normal en la formació de l'ARNm. Aquestes mutacions són un problema quan interrompen el marc de lectura impedit la formació d'una proteïna funcional, pel que l'enfocament terapèutic actual és generar un salt de l'exó o exons afectats (*Exon Skipping*) reparant la pauta de lectura i generant una proteïna més curta però amb certa funcionalitat. Això pot ser induït per petits fragments sintètics d'àcids nucleics coneguts com a oligonucleòtids antisentit (AONs), que es dissenyen per unir-se a les seqüències d'ARN que regulen com es farà l'*splicing* cap a l'ARN missatger d'un gen d'interès. La seqüència eleccionada és eliminada per *splicing* perquè l'AON cobreix el lloc d'*splicing* real de la maquinària d'*splicing*^{82,84} (figura 17).

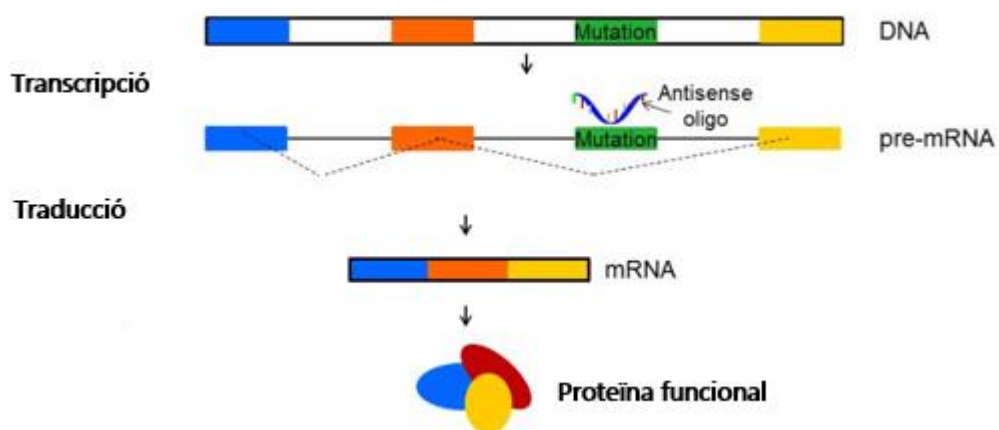


Figura 17: Funcionament de la tecnologia *Exon-Skipping* i els oligonucleòtids antisentit. Extreta i adaptada de Google Imatges, (DMD Makes The Cut | Biotech Primer WEEKLY. Available at: <https://weekly.biotechprimer.com/dmd-makes-the-cut/>).

Aquesta estratègia és teòricament aplicable al 80% dels pacients amb DMD⁹⁶. Les aproximacions més recents estan centrades en produir l'*exon skipping* de l'exó 51, que seria aplicable a aproximadament el 13% dels nens afectes. Dos tipus d'AONs estan en assajos clínics: Drisapersen (també conegut com PRO051 o GSK-2402968) i Eteplirsen (AVI-4658), la eficàcia terapèutica dels quals ha estat demostrada en models animals de DMD (*mdx* i *cxmd*) i per injecció intramuscular en pacients. A continuació es presenten els dos assajos clínics que s'han realitzat amb aquests fàrmacs:

- Assaig clínic amb Drisapersen: tot i que la fase 1 i 2A semblaven prometedores, no van tenir èxit en demostrar una millora significativa en la mesura primària de resultats, el 6MWT durant la fase 3.⁹⁷
- Assaig clínic amb Eteplirsen: també mostrava un resultat prometedors durant la fase 1 i 2A però tampoc van poder demostrar una millora significativa amb el 6MWT. En una segona fase 2 de l'estudi es va incrementar la dosi fent un assaig doble cec amb 12 nois amb DMD d'entre 7 i 13 any que rebien placebo, 30mg/kg/setmana o 50mg/kg/setmana durant 24 setmanes. Posteriorment es va ampliar a 48 setmanes amb adjudicació dels pacients placebo als altres dos grups, i es va veure un increment de les fibres positives per distrofina d'un 47% de mitja. Malgrat aquests resultats prometedors la FDA (Food and Drug Administration) dels Estats Units es va negar a concedir l'aprovació accelerada del fàrmac per discrepàncies amb el disseny de l'assaig.^{87,98}

A més, el lliurament sistèmic encara és limitat a causa de la pobra absorció dels teixits i a la dificultat per assolir l'eficàcia terapèutica suficient.

L'aproximació en aquest tipus de teràpies és molt útil ja que a l'intentar tractar mutacions específiques. Totes aquelles malalties que presentin aquest tipus de mutacions podran ser abordades amb els mateixos compostos o amb la mateixa tecnologia.

b) Teràpies utilitzant iPSCs:

Existeixen estudis preclínic que consisteixen en l'administració de cèl·lules que s'empelten al teixit muscular i es fusionen amb les fibres preexistents (figura 18). En cultiu, les cèl·lules satèl·lit comencen a proliferar produint mioblasts les quals es diferencien per produir miotubs multinucleats. En canvi, quan són trasplantades poden actuar com a cèl·lules mare miogèniques capaces de donar lloc a noves miofibres però també noves cèl·lules satèl·lit. Aquestes cèl·lules poden ser al·logèniques de donants sans o cèl·lules del propi pacient que han estat reprogramades perquè expressin distrofina.⁹⁹

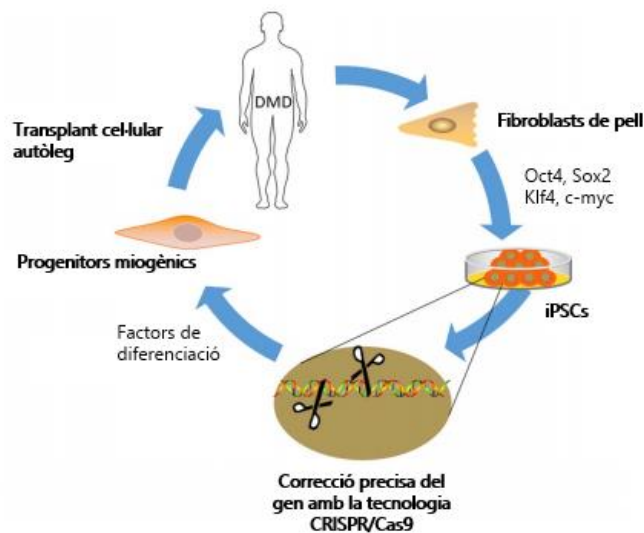


Figura 18: Teràpia gènica usant iPSCs derivades dels propis pacients. Extreta i adaptada de Hagan, M., et. al., 2018.

S'ha demostrat que el trasplantament de cèl·lules pluripotents (iPSCs) derivades de precursors miogènics produeix miofibres positives per distrofina, les quals milloren les propietats contràctils dels músculs dels ratolins distròfics.¹⁰⁰ Malgrat aquests resultats, només es poden lliurar les dosis terapèutiques efectives per mitjà de múltiples injeccions intramusculars, cosa que dificulta molt la seva perspectiva com a teràpia viable actualment.⁸⁴

c) Teràpia per lliurament del gen de la distrofina:

Per editar el genoma, el gen seleccionat i dissenyat s'ha de lliurar dins de les cèl·lules apropiades i integrar-se amb l'ADN de l'hoste.

El gen *dmd* és dels més grans del genoma i per això és impossible l'entrega intracel·lular de tot el gen sencer, pel que l'estratègia es centra en el lliurament de versions truncades de *dmd*, de mini o microdistribines.

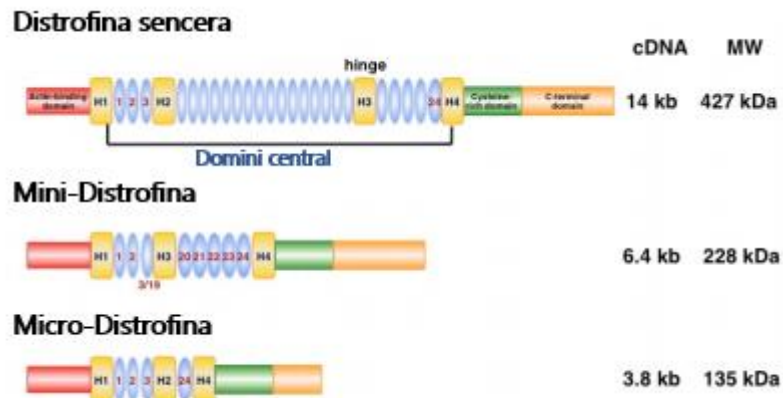


Figura 19: Exemples de mini-distrofina i micro-distrofina utilitzades en terapia. Extreta i adaptada de Okada, T., et. al., 2013.

Aquesta teràpia s'està duent a terme amb Virus Adeno-associats (AAVs) que poden introduir-se de forma local o sistèmica per via intravenosa, intraarterial o per injeccions intraperitoneals.

L'aproximació utilitzada és la de crear virus que contenen versions truncades de *dmd* ja que la distrofina té dominis repetitius que poden ser eliminats i la proteïna mantindrà la seva funció última. Per això, se solen utilitzar els serotips vírics que presenten un elevat tropisme pel múscul, que són AAV6, AAV8 i AAV9.^{101,102}

Aquesta estratègia ha demostrat en ratolins que és capaç de restaurar la morfologia de les miofibres, la histologia i la integritat de la membrana, a més d'aconseguir augmentar les propietats contràctils dels músculs.¹⁰³

A més, en el model caní s'ha trobat que són capaços de millorar la patologia, augmentar la força muscular i disminuir els símptomes distròfics durant gairebé 2 anys.¹⁰⁴

En humans, els assajos clínics realitzats estan encarats a determinar el potencial de l'alliberament intramuscular del virus amb minidistrofina, i tot i que són capaços de veure acumulació vírica als músculs, no hi ha un augment de

l'expressió de distrofina. Això és degut a que es produeix una resposta immunitària contra la distrofina de nova creació perquè el teixit és incapaç de reconèixer-la com a pròpia. També s'ha descrit una resposta immune als AAV.¹⁰⁵

d) Edició gènica per CRISPR/Cas9:

Cas9 és una nucleasa natural que se sol utilitzar amb una guia d'ARN (ARNg) específica que es dissenya per realitzar una edició de l'ADN acurada. Ho fa unint-se a una regió constant del ARNg i la seva seqüència variable es dissenya perquè sigui complementària a la seqüència d'ADN de la regió d'interès.

Recentment, s'ha utilitzat per deletar un o més exons de la distrofina en cèl·lules de pacient i de ratolí distròfic i s'ha observat una millora de les propietats contràctils. A més, el lliurament local i sistèmic restaura l'expressió de distrofina en el múscul esquelètic i cardíac del ratolí i augmenta la força.¹⁰⁶

En tots aquests casos l'eficàcia del lliurament és clau pel tractament de tots els músculs afectes.

També s'ha intentat posar el focus en editar amb CRISPR/Cas9 les cèl·lules satèl·lit dels pacients, i diversos laboratoris diferents han observat estudis prometedors.¹⁰⁷ A més, s'ha utilitzat aquesta metodologia per produir un primat distròfic.¹⁰⁸

Al 2014 van demostrar la utilitat de l'edició genòmica de les cèl·lules germinals per corregir els defectes genètics primaris en el ratolí *mdx*. Això no és possible encara en cèl·lules humanes.¹⁰⁹

1.3.5.2 Teràpies modificadores de la patologia

a) Per gens substituïts:

Com és el cas de la utrofina, amb la que s'intenta evitar la resposta immune contra la distrofina. Aquesta teràpia consisteix en la sobreexpressió de la utrofina pel tractament amb Ezutromib (SMTTC1100), una molècula petita oralment biodisponible que modula la proteïna i aconsegueix revertir el fenotip distròfic en el ratolí *mdx*. La fase 1B de l'assaig clínic va començar el desembre de 2013.⁸⁷

També s'ha vist que utilitzant AAV amb el gen de la Follistatina (rAAV-Follistatin) millora la histologia i augmenta la massa muscular i la força en el ratolí distròfic i en primats no humans. A més, està en fase 1 d'assaig clínic per BMD.

El doble lliurament de vectors adeno-associats que porten microdistrofina i follistatina aconsegueix restaurar la força i augmentar la resistència a les contraccions excèntriques.⁸²

b) Per moduladors de la patologia:

És el cas de l'Idebenona o el Givinostat.

En el primer cas, està descrita una disminució de la capacitat vital i la funció respiratòria en els pacients amb DMD, pel que aquest fàrmac actua a aquest nivell. Actualment es troba en assaig clínic en fase 3 en pacients d'entre 10 i 18 anys sense tractament concomitant amb glucocorticoides. La Idebenona (900mg/dia) disminueix significativament la pèrdua de funció respiratòria.^{110,111}

Pel que fa al Givinostat, es tracta d'un inhibidor de les deacetilases d'histones, que poden ajudar a reequilibrar el procés de reparació del múscul augmentant la regeneració. En ratolí *mdx* s'ha vist que disminueix significativament la fibrosi i promou una regeneració muscular compensatòria. L'assaig clínic ha demostrat un augment significatiu de la fracció de teixit muscular i una disminució del teixit fibròtic en les biòpsies del grup amb Givinostat.¹¹²

Encara que cap d'aquests mètodes ha estat completament exitós per ser considerat com una teràpia eficaç, alguns d'ells mostren promeses significatives i són indicatius de que aquestes teràpies semblen estar encaminades cap a la direcció correcta.

1.3.6 ÚS DE NANOPARTÍCULES PER L'ALLIBERAMENT DE FÀRMACS A MÚSCUL

Un dels principals reptes a batre en el tractament de la DMD és aconseguir que el possible tractament arribi a tots els músculs que han de ser tractats (incloent cor i músculs respiratoris). És per això que una altra aproximació és dissenyar sistemes d'alliberament dirigit dels fàrmacs. En aquest àmbit ja hem parlat dels vectors adeno-associats que supleixen aquest efecte, però actualment hi ha altres sistemes en investigació, com l'ús de nanopartícules.

Es van crear sistemes de lliurament de fàrmacs basats en nanopartícules per guiar les drogues convencionals al seu lloc d'acció específic i així millorar l'eficàcia, simplificar l'administració de fàrmacs i superar els efectes secundaris derivats d'una acció difusa. Les nanopartícules (NP) són partícules microscòpiques amb una mida que oscil·la entre 1-100nm, que es troba entre petites proteïnes i virus.¹¹³

Les NPs es classifiquen com a orgànics o inorgànics depenent de la seva naturalesa. Les NPs orgànics estan formats per sistemes polimèrics, com els dendrímers o per bicapa lipídica, com els liposomes, mentre que les NP inorgànics estan formats per metalls i altres materials inerts, com el titani, l'or o la sílice.^{114,115}

Taula 4: Les nanopartícules més rellevants usades.

Tipus de NP	Descripció
Orgànic	NPs Polimèriques Formades per una matriu de polímer. Depenent del polímer poden tenir una biodistribució no específica i una càrrega baixa. Són propensos a la hidròlisi i la degradació enzimàtica.
	Dendrímers Macromolècules definides amb una estructura altament ramificada formada per un nucli i diverses capes. La seva estructura els permet portar diverses càrregues.
	Liposomes Nanosistemes esfèrics formats per una bicapa lipídica. Permet l'encapsulat de fàrmacs hidrofòbics i hidròfils. La seva ràpida eliminació de l'organisme és una de les seves principals limitacions.
	Micel·les Agregats col·loïdals de molècules amfifíliques. Els seus dominis hidrofòbics interns i exteriors hidrofílics permeten l'encapsulat de medicaments no polars per al transport.
Inorgànic	NPs de Sílice Inert, biodegradable i amb bones propietats de biodistribució. Es poden sintetitzar fàcilment amb qualsevol mida i forma desitjables.
	NPs d'or Sense toxicitat intrínseca. Les seves propietats òptiques i electròniques depenen totalment de la seva forma i mida. S'ha provat el seu ús antibacterià.
	Nanotubs de carboni Monocapes de grafè embolicades en forma de cilindre. La seva elevada superfície augmenta la seva capacitat d'ancoratge a diferents molècules. Són tòxics si no funcionen correctament.

Entre els diferents tipus de NP, les nanopartícules inorgàniques basades en sílice mesoporosa (MSN) han sorgit com a biomaterials prometedors a causa de les seves propietats excepcionals en quant a qualitat química i morfològica, a més de tenir una biocompatibilitat bona. Es tracta d'una matriu de sílice plena de cavitats poroses que permeten una alta càrrega de drogues i a l'hora es manté la mida petita.

A més, la superfície de MSN és rica en grups de silanols reactius, que són capaços de conjugar amb gairebé tots els tipus de grups funcionals, que tenen diferents finalitats com ara lligands, polímers i agents fluorescents (fluorocroms, anticossos, polímers biodegradables (PEG), entre d'altres)¹¹⁶ (figura 20). Les molècules PEG s'utilitzen per reduir l'agregació i l'acumulació de les partícules als òrgans d'eliminació.

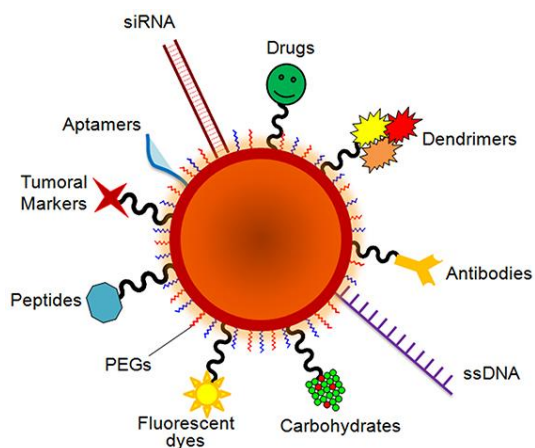


Figura 20: Possibilitats de càrrega de les MSNs. Extreta de Conde, J. et. al., 2014.

A més, diversos informes demostren una baixa citotoxicitat dels MSN, fet que també demostra la seva bona biocompatibilitat. Algunes de les característiques més importants de les MSN són:

- Elevada àrea de superfície ($>1000\text{m}^2/\text{g}$), el que permet una gran càrrega (fins al 35%).
- Alt volum del porus ($>1\text{cm}^3/\text{g}$).
- Estabilitat química i tèrmica.
- Control de la mida i forma.
- Fàcil de sintetitzar i modificar.
- Mesoestructura estable.
- Citotoxicitat baixa.
- Elevada biocompatibilitat.

Generalment, les drogues es carreguen en MSN adsorbint-les sobre les partícules i alliberant-les al mitjà desitjat. Amb aquestes MSN, però, no hi ha cap control sobre l'obertura de porus, donant com a resultat un llançament del contingut de cop i sense poder dominar on volem que s'obri el porus. No obstant això, és possible aconseguir sistemes de llançament controlat basats en MSN mitjançant l'aplicació de controls mecànics sobre les obertures dels porus. A través del límit i l'obertura de l'entrada de porus, es poden construir vehicles que permetin un transport selectiu i un alliberament eficient en resposta a un estímul específic. Hi ha dos tipus principals d'estímuls, interns (com el pH, la temperatura, reaccions redox o activitat enzimàtica) o externs (la llum o camps magnètics). Els estímuls externs tenen l'avantatge que es poden controlar a temps i lloc.^{113,117-119}

Els MSN també es poden dirigir a un òrgan o lloc específic de l'organisme. Hi ha tres estratègies principals d'orientació per aconseguir el lliurament de fàrmacs a llocs específics, que són:

- Estratègia passiva: les MSN s'acumulen al lloc d'interès en absència de lligants. En aquest cas, l'eficàcia d'acumulació només està determinada per les característiques fisicoquímiques de la nanopartícula (mida, forma, superfície...). Es basa en l'efecte de permeabilitat i retenció (EPR) millorat. És un fenomen que no només és evident en els tumors, on es produeix una angiogènesi de vasos amb endoteli discontinu amb fenestracions que permet el creixement ràpid del teixit cancerós i que resulten molt permeables, si no també en totes les patologies que impliquen una elevada extravasació (des d'una infecció fins a una insuficiència cardíaca...).
- Estratègia activa: implica la modificació de la superfície de la nanopartícula afegint lligand que tenen una afinitat específica per determinats receptors o per altres molècules del teixit diana. Es considera que és complementària a l'efecte EPR per incrementar l'eficiència del lliurament a lloc específic.
- Estratègia basada en camp magnètic: es pot aconseguir mitjançant l'aplicació d'un camp magnètic extern que sigui capaç de dirigir les nanopartícules magnètiques i, per tant, augmenta la seva acumulació al lloc objectiu.^{113,120}

L'ús de nanopartícules obre un ventall d'opcions terapèutiques per millorar l'alliberament de fàrmacs a múscul i incrementar la seva funció localment.

OBJECTIUS

Els trastorns neuromusculars pediàtrics són malalties minoritàries causades per un gran nombre de gens, molts d'ells de gran mida i estructura complexa, fet que dificulta enormement el diagnòstic molecular i el disseny de noves estratègies terapèutiques. Alhora són malalties sovint multisistèmiques, que involucren a molts professionals, pel que el maneig d'aquests pacients és també complex.

Davant aquest gran repte, aquesta tesi s'ha centrat en dos fites principals. Per una banda, en analitzar l'abordatge de dues aproximacions terapèutiques per a la DMD, i, en segon lloc, en la optimització de les eines diagnòstiques pels pacients amb malalties neuromusculars.

Per a dur a terme aquesta fita es van definir els objectius principals següents:

1. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES

- Aprofundir en el coneixement de l'efecte dels estrògens en el múscul esquelètic deficient en distrofina, incloent els següents objectius específics:
 - a. Avaluar l'efecte del estrògens sobre la lesió muscular causada per la deficiència de distrofina, en el model murí *mdx* en diferents condicions i edats, mitjançant anàlisi fenotípica: tests motors, anàlisi de CK i histologia muscular.
 - b. Analitzar el mecanisme pel qual actuen els estrògens mitjançant anàlisi d'expressió gènica diferencial.

Donats els resultats d'aquest primer objectiu:

- c. Entendre la implicació de p75^{NTR} en la distròfia muscular en el model murí i en mostres de pacients afectes de DMD
- Comprovar l'efecte del fàrmac amb activitat *read-through* PTC124 sobre les mutacions *nonsense* en el model murí *mdx*, definint aquests objectius específics:
 - a. Avaluar l'eficàcia del tractament i la recuperació de l'expressió de distrofina.

Donats els resultats d'aquest primer objectiu, per tal d'augmentar l'eficàcia del fàrmac:

- b. Analitzar l'eficàcia de nanopartícules mesoporoses de sílice (MSNs) com a vehicles d'alliberament del fàrmac a múscul,

2. NOVES EINES MOLECULARS

- a. Analitzar el rendiment diagnòstic de noves tècniques de seqüenciació masiva (exoma complet i exoma clínic) en pacients amb trastorns neuromusculars pediàtrics.
- b. Validar els resultats obtinguts, estudiant en alguns casos la implicació funcional de variants de significat incert (VUS).

MATERIALS I MÈTODES

3.1 Animals

Es va utilitzar el model murí de distrofinopatia, *mdx* (C57BL10/ScSn-mdx) i el seu respectiu control (C57BL10/ScSn) que van ser adquirits a *Jackson Laboratories*. Aquests animals s'han mantingut a l'estabulari de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron sota condicions controlades de temperatura i humitat, amb un cicle de 12 hores de llum i 12 hores de foscor i amb aliment i aigua *ad libitum* d'acord amb la normativa del Reial Decret nº223 (1998). Tots els procediments són duts a terme segons les normes institucionals, que segueixen els requisits establerts pel Govern d'Espanya i la Comunitat Europea (BOE 67, 18/3/88, RD 223/1988 y BOE 256, 2/10/90) i prèviament aprovats pel Comitè Ètic de l'Experimentació Animal de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón.

3.2 Mostres humanes

Es van fer servir mostres provinents de biòpsies musculars de pacients, recollides a la col·lecció del laboratori de Neurologia Pediàtrica del VHIR, amb referència C.0003146 en el Registre Nacional de Biobancs de l'Institut de Salut Carlos III . Les biòpsies es realitzen amb finalitat diagnòstica després d'obtenir el consentiment informat dels responsables dels pacient. Una part de la biòpsia arriba al laboratori i es congela habitualment en sec tenint en compte les possibles proves complementàries. I si hi ha mostra suficient, una part es processa per a la obtenció de mioblasts en cultiu.

Per a aquests estudis s'han usat mostres de pacients DMD (n=4) i controls (n=4).

3.3 Tractaments

3.3.1 17 β -Estradiol

Es va iniciar a les 3 setmanes de vida, moment que coincideix amb el deslletament, i es va mantenir durant 1 mes. Idòniament s'utilitzaven ventrades amb un mínim de 4 animals mascles per poder tractar 2 animals amb estradiol i 2 amb placebo, com a control. El que es feia era adormir els animals amb anestèsia inhalatòria (isofluorà), instil·lant methocel 2% (*Omnivision*) als ulls per evitar lesions corneals, es rasurava la zona entre els dos omòplats amb unes pinces i s'efectuava una petita incisió en aquesta regió per tal d'introduir el pellet ja sigui de placebo (*Pellets placebo for 17 β -Estradiol d'Innovative Research of America*) o estradiol (*Pellets de 0,5mg de 17 β -Estradiol d'Innovative Research of America*) a la màxima profunditat i per sota del greix. El pellet es liposoluble i l'estradiol es va alliberant de manera constant amb una durada d'acció prevista de dos mesos. Un cop introduït el pellet, se sutura la ferida i es reanima l'animal.

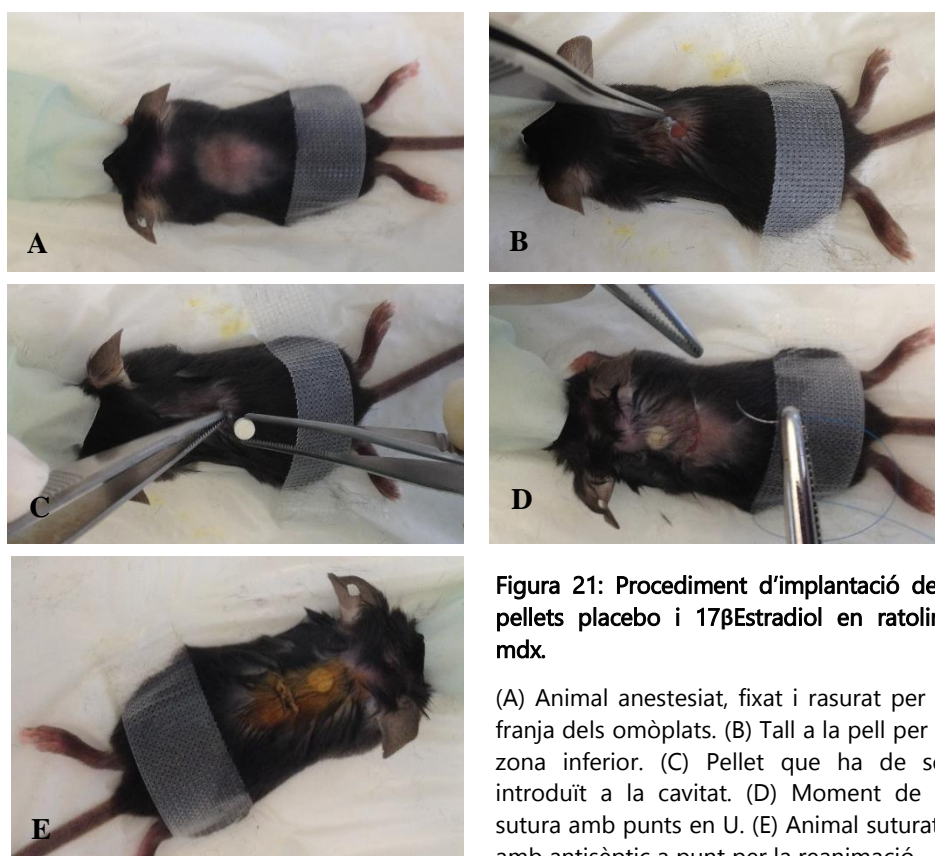


Figura 21: Procediment d'implantació dels pellets placebo i 17 β Estradiol en ratolins mdx.

(A) Animal anestesiàt, fixat i rasurat per la franja dels omòplats. (B) Tall a la pell per la zona inferior. (C) Pellet que ha de ser introduït a la cavitat. (D) Moment de la sutura amb punts en U. (E) Animal suturat i amb antisèptic a punt per la reanimació.

El disseny experimental dels experiments amb 17 β -Estradiol és el presentat a la Figura 22.

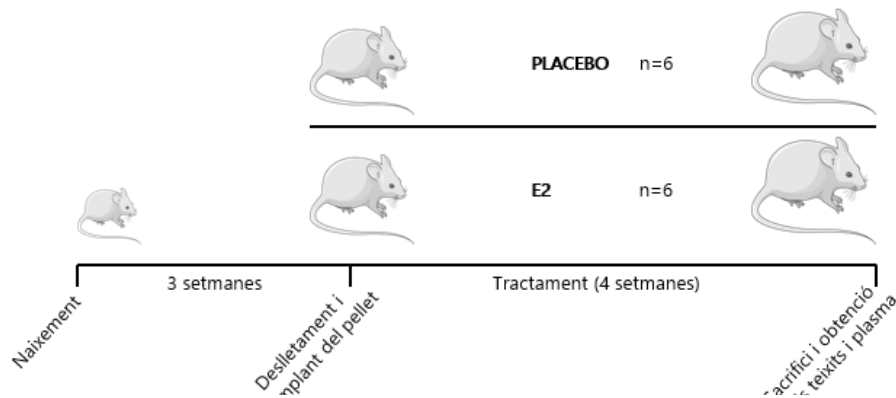


Figura 22: Disseny experimental del tractament amb 17 β -Estradiol.

Els animals van ser controlats setmanalment per la seva evolució i pes. Durant el tractament es va tenir en compte la possible pèrdua de pes, el seu aspecte i conducta (si es troba comatós o agressiu) i les possibles mostres de dolor. El segon grup d'animals (experiments 3, 4 i 5) es van sotmetre a tests funcionals amb la finalitat de veure potenciat els efectes de l'estradiol en el múscul, empitjorar el fenotip distròfic amb l'exercici i fer més evident la patologia del ratolí *mdx*. El número d'animals tractats i el moment de tractament es reflecteixen en la taula 5. A partir d'ara ens referirem al 17 β -Estradiol com E2.

Taula 5: Animals tractats amb E2.

EXPERIMENT	EXERCICI	PLACEBO	ESTRADIOL
1	No	2 animals	2 animals
2		4 animals	4 animals
3	Si	4 animals	5 animals
4		3 animals	3 animals
5		2 animals	2 animals

3.3.2 LM11A-31

El LM11A-31 és una molècula petita moduladora del receptor de baixa afinitat de les neurotrofines, Ngfr o p75^{NTR}. Aquest fàrmac té un perfil d'agonista parcial d'aquest receptor i promou la senyalització relacionada amb la supervivència.¹²¹ S'ha demostrat el seu efecte positiu en la malaltia d'Alzheimer i en la lesió cerebral traumàtica.^{122,123}

Es va realitzar el tractament en una camada de 8 mascles que van ser dividits de forma aleatòria en els grups control (n=4) i tractat amb LM11A-31 (*Sigma Aldrich*) (n=4).

El tractament s'iniciava a partir del deslletament, a les tres setmanes de vida i amb una duració d'un mes. Va consistir en immobilitzar l'animal per les espatlles i introduir la xeringa dispensadora per la boca poc a poc i suficientment endins com per dirigir la droga directament a l'estómac, evitant obstruir els pulmons (figura 23).

S'administrava el fàrmac LM11A-31 un cop al dia i a una dosi de 50mg per kg de pes del ratolí. A més, els dos grups d'animals van realitzar assajos funcionals un cop per setmana i van ser controlats en evolució i pes. Es van tenir en compte els mateixos criteris de conducta, aspecte i mostres de dolor que en el tractament anterior.



Figura 23: Injecció oral de LM11A-31.

L'animal es va immobilitzar per les espatlles i la xeringa es va introduir per la boca per administrar la droga.

El disseny d'aquest experiment es representa a la figura 24.

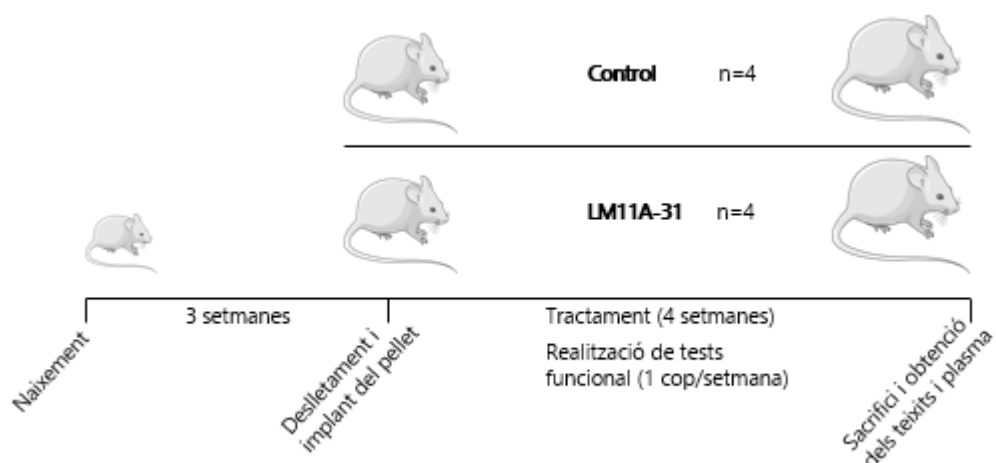


Figura 24: Disseny experimental del tractament amb LM11A-31.

Els animals començaven el tractament a les tres setmanes d'haver nascut, en el moment del deslletament. S'administrava el fàrmac per via oral un cop cada dia i es monitoritzava setmanalment el pes i l'evolució funcional. Després de quatre setmanes de tractament, se sacrificaven els animals i es recollien les mostres d'interès. Es van tractar quatre animals en cada condició.

3.3.3 Fàrmacs *read-through* i ús de nanopartícules:

3.3.3.1 Fàrmacs emprats

El compost amb capacitat *read-through* que va ser utilitzat en els nostres experiments va ser el PTC124 (importat i purificat pel Dr. Arad, col·laborador del projecte).

Taula 6: Fàrmac amb activitat *read-through* emprat.

COMPOSTOS	FÒRMULA	PES MOLECULAR	PROVEIDOR
PTC124	C15H9FN2O3	284.24	Aportat pel Dr. Arad

3.3.3.2 Tractament amb PTC124 intraperitoneal

Per aquest experiment també es van utilitzar ratolins mascles de 8 setmanes d'edat. Pel primer grup (tractats amb PTC124) es van utilitzar 5 animals i pel segon (injectats amb el vehicle, DMSO), 4. El grup tractat va ser injectat amb 2mg de PTC124 resuspesos en 1ml de 20% de DMSO en PBS 1X, i l'altre grup va ser injectat directament amb 1ml de 20% de DMSO en PBS 1X. Les solucions van ser administrades per via intraperitoneal durant dues setmanes amb injeccions diàries seguint el disseny: una injecció de 250 μ l a les 8h del matí, una altra del mateix volum a les 12h i una última de 500 μ l a les 16h, segons el protocol seguit per PTC Therapeutics^{TM93}. A més, cada setmana els animals van realitzar assajos funcionals, es va anar controlant la seva evolució i pes i se'ls hi va extreure plasma dos cops durant el tractament (durant la primera i segona setmana) per la vena safena amb la finalitat d'avaluar els nivells de CKs i la presència de PTC124. Aquest últim pas es va preveure que es faria per mitjà de cromatografia líquida d'elevada eficàcia a l'Institut Químic de Sarrià (IQS).

3.3.3.3 Nanopartícules

L'Institut Químic de Sarrià (IQS) va desenvolupar i proveir les nanopartícules mesoporoses de sílice utilitzades en els nostres experiments. Les MSN són nanopartícules esfèriques amb un diàmetre de 50-60nm i una grandària de porus de 2,3nm (el compost PTC124 mesura 1.24nm) marcades amb un 7% d'Alexa Fluor[®] 680 (*ThermoFisher Scientific*) (longitud d'ona d'excitació: 684nm, i longitud d'ona d'emissió: 702nm). Pels nostres experiments es van utilitzar dos tipus de MSNs; la diferència entre la primera i la segona generació de MSNs és que aquestes últimes van ser carregades covalentment amb molècules d'un polímer biodegradable (van ser, PEGilades) amb un 20% de polietilenglicol. S'ha reportat que les nanopartícules de sílice PEGilades s'acumulen menys en els òrgans del sistema mononuclear fagocític (MPS), tenen una vida en sang més llarga i presenten una taxa d'eliminació renal més lenta després d'una administració intravenosa que les nanopartícules no PEGilades¹²⁴. Les nanopartícules de primera i segona generació seran anomenades com a MSNs i MSNsPEG a partir d'ara.

Les nanopartícules MSNsPEG van ser carregades amb un 3-11% de PTC124. En condicions fisiològiques, s'allibera el 55% del fàrmac carregat.

Totes les nanopartícules es van resuspendre en solucions salines fisiològiques estèrils (0,9%) a una concentració final de 4mg/ml i guardat a 4°C i en condicions de foscor. Abans de cada injecció la solució corresponent es dispersava amb ultrasons durant una hora.

3.3.3.4 Biodistribució de les nanopartícules de primera generació

Per determinar la biodistribució de les nanopartícules es van utilitzar ratolins *wt* (n=3) i *mdx* (n=2) de 8 setmanes d'edat. Es van utilitzar dos ratolins *wt* sense injectar com a controls de fluorescència a l'hora d'adquirir les imatges, dos *wt* i dos *mdx* als que si se'ls varen injectar les MSNs, però a un dels *wt* se li va induir un procés de necrosi i inflamació aguda al gastrocnemi dret el dia abans de la injecció amb NPs mitjançant l'administració de Cardiotoxina¹²⁵ (*Sigma Aldrich*) (figura25).

Aquest procés va consistir en adormir l'animal amb isofluorà, col·locar-lo cap per avall, fixar i instil·lar methocel 2% (*Omnivision*) als ulls. A continuació es va retirar el pèl de la zona del gastrocnemi mitjà, es va fer una incisió a la pell deixant accessible una zona d'1cm de llarg aproximadament i a la vista tendó i vena. A una distància de 5mm del final del tendó i sense tocar la vena es van injectar 50µl de cardiotoxina (CTX) amb una xeringa que porta un caputxó que deixa lliure només 2mm de l'agulla, per tal de controlar la profunditat de l'administració. S'acabava la intervenció suturant la pell amb punts en U amb fil de 6-0s, es reanimava l'animal i se li retirava el methocel dels ulls.

Posteriorment, els animals van ser injectats amb 100µl de nanopartícules a una concentració de 4mg/ml per la vena de la cua. Als 30 minuts de la injecció, es va llegir la fluorescència a la Plataforma d'Imatge Molecular de l'estabulari del VHIR.

3.3.3.5 Biodistribució de les nanopartícules de segona generació

Per conèixer la distribució de les noves nanopartícules amb molècules PEG a la seva superfície, es van injectar MSNsPEG a: un animal WT, que prèviament se li havia induït dany mitjançant CTX al GMG dret, 30 minuts abans del sacrifici. També a dos ratolins *mdx* les 24 i 4 hores abans de portar els animals a la Plataforma d'Imatge Molecular per prendre les mesures de fluorescència i quantificar-ho. Es va utilitzar un animal wt i un *mdx* no injectats com a control de fluorescència (figura 25).

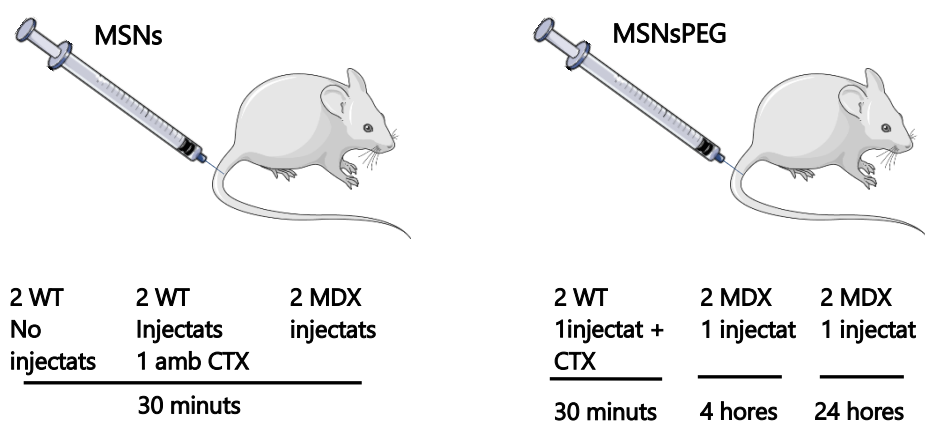


Figura 25: Disseny experimental per estudiar la biodistribució de les NPs de primera (MSNs) i segona generació (MSNsPEG).

Resum dels dos experiments realitzats: el primer d'ells als 30 minuts post-injecció i el segon, quan els animals feien 30 minuts, 4 hores o 24 hores post-injecció.

3.3.3.6 Tractament amb NPs carregades amb PTC124

Per tal de comprovar que l'administració de PTC124 en les NPs millora la biodistribució del fàrmac, es van utilitzar ratolins mascles *mdx* de 8 setmanes d'edat: 2 animals es van deixar sense injectar, 3 es van injectar amb MSNsPEG i 3, amb MSNsPEG carregades amb un 3-11% de PTC124 a una concentració de 4mg/ml per la vena de la cua. Les injeccions van ser realitzades per la Dra. Carmen Espejo del grup de Neuroimmunologia Clínica del VHIR. El disseny experimental va consistir en injectar les NPs dos cops per setmana, realitzar un assaig funcional un cop per setmana i extreure plasma per fer control de NPs i CKs a l'inici de cada setmana. La durada del tractament va ser la mateixa que en el tractament amb PTC124 intraperitonealment, 4 setmanes. La quantificació es va portar a terme a la Plataforma d'Imatge Molecular a les 24 hores de l'última injecció. Els tractaments realitzats es recullen a la taula 7.

Taula 7: Tractaments amb fàrmacs *read-through* realitzats.

COMPOST	CONCENTRACIÓ	VOLUM ^A	FREQÜÈNCIA ^B	DURADA ^C	ANIMALS ^D	VIA ^E	TEMPS ^F
MSNSPEG-PTC124	4 mg/mL (PTC124 dosi: 3µg/g)	100 µL	2 cops/setmana	4 setmanes	3/3	IV	24h
PTC124	2 mg/mL	1 mL (250/ 250/500µl)	3 cops/dia (8, 12 i 16h)	2 setmanes	5/4	IP	18h

(A) Volum administrat. (B) Freqüència d'administració. (C) Durada del tractament. (D) Animal tractats (compost/vehicle). *L'animal amb vehicle és el mateix pels tres compostos *read-through*. (E) Via d'administració. (F) Temps que passa des de l'administració fins al sacrifici.

3.3.3.7 Quantificació de la fluorescència de l'animal *in vivo* i dels teixits

Les MSNs van ser marcades amb un Alexa Fluor[®] 680 per poder veure la seva biodistribució *in vivo*, i la presa d'imatge es va realitzar a la Plataforma d'Imatge Molecular de l'estabulari del VHIR amb l'aparell Xenogen IVIS[®] Spectrum Imaging System.

Per tal de quantificar la fluorescència *in vivo*, va ser necessari rasurar tot l'animal el dia abans, ja que el pèl negre interfereix en la mesura; i per les mesures *ex vivo*, es van utilitzar les extremitats posteriors i anteriors, els ronyons, la melsa, el fetge, el diafragma, el cor, els pulmons i el cervell.

Totes les dades recollides per la Plataforma d'Imatge Molecular van ser quantificades utilitzant els *Software* Living Image v4.5.2 (*Xenogen*).

Les mesures es prenen a la imatge original, sense extreure el marcatge de fons de la fluorescència de l'animal control, i per les mesures de cada òrgan es fa una quantificació denominada "*ROI-based*": es defineix una àrea com a regió d'interès (ROI) que inclou l'òrgan que volem quantificar i es mesura la intensitat de fluorescència d'aquesta àrea. S'utilitza el mateix ROI per quantificar tots els òrgans del mateix experiment per obtenir resultats comparables. Les dades es recullen en unitats d'eficiència radiant ($[p/s]/[\mu W/cm^2]$) (figura 26).

Els valors obtinguts dels animals controls representen la fluorescència de fons de tots els animals i només s'extreuen a l'hora de fer les representacions gràfiques.

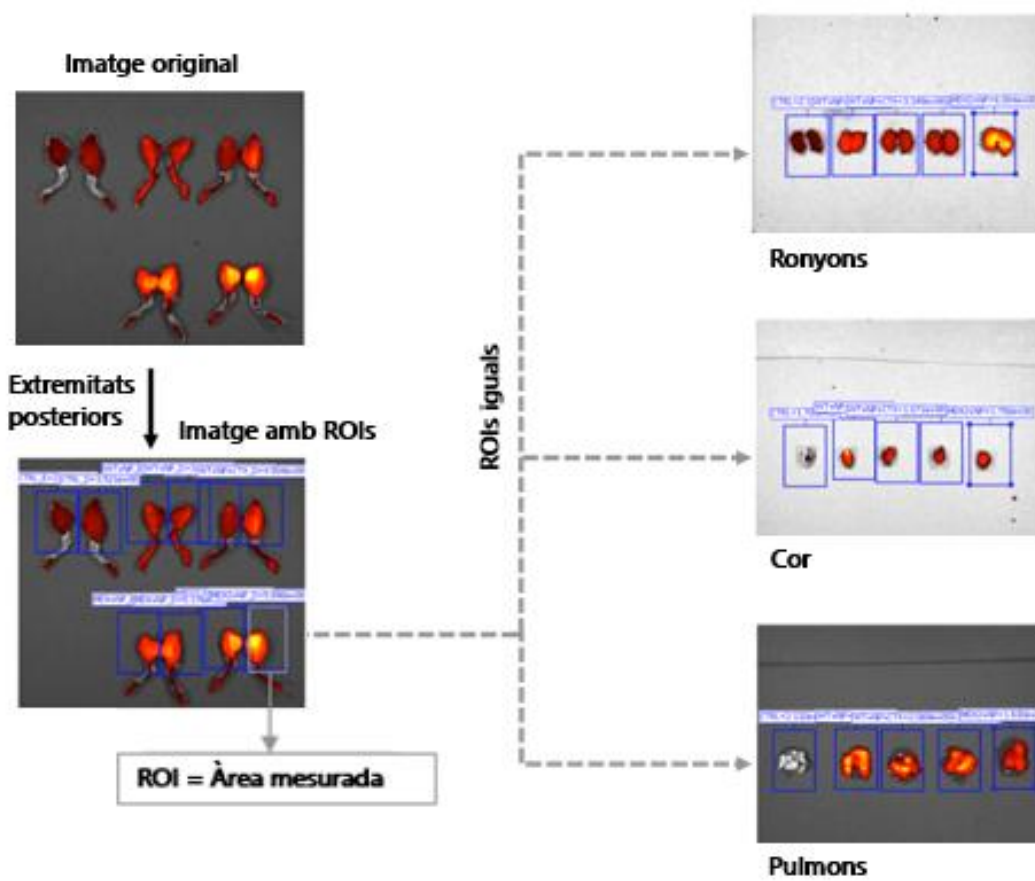


Figura 26: Quantificació de la fluorescència de les nanopartícules en els teixits *ex vivo*.

Totes les mesures es van prendre amb els mateixos ROI o sigui la mateixa mida de regió d'interès.

3.4 Tests funcionals:

Un cop per setmana, es van realitzar estudis funcionals en els grups d'animals que es mostren a la taula següent.

Taula 8: Animals que han realitzat els tests funcionals.

TRACTAMENT	ANIMALS ^A
17 β ESTRADIOL	9/8
LM11A-31	4/4
MSNsPEG	3/3
PTC124	5/4

(A) Animal tractats (compost/vehicle o placebo).

En tots els casos es van realitzar dos assajos funcionals utilitzant els protocols estàndards (SOPs) segons *Treat-NMD, Neuromuscular Network*¹²⁶.

1. Test de suspensió per dues extremitats (en anglès, *Two-limb hanging test* i el SOP: *DMD_M.2.1.004*) que consisteix en avaluar la força i la coordinació de l'animal. Es tracta de suspendre els ratolins d'un penjador de filferro elevat a 35 cm per sobre d'una superfície recoberta capaç d'amortir la caiguda de l'animal. Els ratolins en pengen durant 600 segons i s'examina la seva resistència. Si un ratolí cau abans del límit de 180 segons, es fan dos assaigs més, i per l'anàlisi se selecciona el temps més llarg que han aguantat.
2. Test de suspensió per les quatre extremitats (en anglès, *Four-limb hanging test* i el SOP: *DMD_M.2.1.005*) que mesura la força d'adherència. Els ratolins es col·loquen en una reixa, on s'agafen i aguanten utilitzant les quatre extremitats. Després, la reixa es capgira 35 cm per sobre de la caixa contenint la superfície amortidora i es calcula el temps que els ratolins aguanten fins a caure. S'utilitzen els mateixos criteris de temps i intents que en l'altre assaig i se selecciona el temps més llarg que ha aguantat cadascun dels animals.

3.5 Recollida de mostres dels ratolins

De cada animal es va recollir:

- Sang, que es va extreure per punció intracardíaca un cop l'animal estava profundament anestesià i abans del sacrifici per dislocació cervical. D'aquesta sang se'n va separar el plasma, centrifugant 10 minuts a 13.000 rpm i a 4°C.
- Els dos gastrocnemis (GMG), un es va congelar en isopentà i submergir en OCT™ Compound (*Tissue-Teck*) per poder realitzar talls en criostat, col·locat en orientació transversal. L'altre directament es va congelar en nitrogen líquid. De la mateixa manera es van processar els dos quàdriceps. En alguns casos, també es van extreure els tibials anteriors.
- Altres músculs afectes com el diafragma i el cor es van congelar directament en nitrogen líquid.
- I els altres òrgans (testicles, fetge i cervell) van ser congelats i preservats en cas de necessitar-los per futurs estudis.

Les mostres congelades directament en nitrogen líquid es van conservar a -80°C i els plasmes es van conservar a -20°C fins el moment de la seva utilització.

3.6 Mesura dels nivells de CK i estradiol

Les mostres de plasma de cada ratolí van ser enviades al Servei de Bioquímica Clínica Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona per a que es realitzés la mesura dels nivells de CKs, d'estradiol i de testosterona en sèrum. L'assaig de CK es realitza utilitzant l'*Olympus System Reagent* (Beckman Coulter) i l'aparell *Olympus Analyzer AU400SR*. La mesura de 17 β -estradiol es va realitzar amb un comptador quimioluminiscent *Immulite* utilitzant un kit d'ELISA *Immulite Estradiol* de Siemens Healthcare Diagnostics.

3.7 Estudi histològic del múscul

En aquests estudis es va analitzar el múscul quàdriceps perquè és força accessible, està present per duplicat i és funcionalment molt actiu. A més de tot això, el grup té una àmplia experiència en l'anàlisi histològic d'un altre teixit muscular molt estudiat en aquesta patologia, el Gastrocnemi (GMG)^{127,128}.

Per poder dur a terme l'estudi histològic, es col·locava el múscul quàdriceps sobre la platina del criostat adherint-lo amb OCTTM Compound (*Tissue-Teck*). Les seccions seriades es van obtenir en criostat Microm HM505E (*Thermo Fisher Scientific*). Es van realitzar seccions de 10 µm, rebutjant-ne les 50 primeres i es van recollir les següents en diferents porta-objectes, alternant els porta-objectes de forma que els talls no son consecutius i es produeix una diferència de µm determinada entre seccions. Les seccions es van fixar sobre els porta-objectes tractats amb Polysine Slides (*Thermo Scientific*) per millorar l'adherència.

Es va utilitzar la tinció d'hematoxilina-eosina (H-E) per a la histologia descriptiva. Va consistir en una tinció amb hematoxilina de Harris i després amb eosina groguenca, seguides d'una deshidratació en concentracions creixents d'alcohols i finalment xilens. El muntatge final es va realitzar amb *DPX mounting medium* (*Sigma Aldrich*). Amb aquesta tinció, es valora l'aspecte del múscul i es poden apreciar les característiques de les fibres musculars, la presència d'infiltrat inflamatori, i la presència o absència de fagocitosi.

Per observar l'acúmul de calci en les fibres, es va utilitzar la tinció Alizarin Red S (*Abcam*), un compost que reacciona amb el calci i tenyeix el teixit amb una coloració roig-ataronjada.^{129,130} I per identificar la fibrosi es va emprar la tinció del Tricròmic de Masson. Es van fer fotografies de les preparacions a 10X o 20X en un microscopi invertit FSX100 Olympus i/o amb un microscopi convencional BX61 Olympus. Finalment, es van analitzar les imatges amb l'ajuda del Software ImageJ.

3.8 Anàlisi d'expressió gènica per Microarrays

Per tal de comprovar si els tractaments provocaven una variació de l'expressió gènica de factors capaços de modificar la progressió de la malaltia, es va realitzar un anàlisi d'expressió gènica en el múscul quàdriceps mitjançant microarrays. Per fer aquest anàlisi es van utilitzar 4 animals tractats amb estradiol i 4 animals amb placebo.

3.8.1 Preparació dels teixits

Primer de tot, es van triturar els teixits, polvoritzant el múscul en un morter amb la mà de morter, afegint nitrogen líquid per evitar que es descongeli el teixit. Quan estava tot suficientment triturat, es va recollir el polsim amb l'ajuda d'una espàtula i d'una punta de pipeta i es va col·locar en tubs eppendorf (en funció de la quantitat de teixit triturat) que prèviament s'havien refredat en nitrogen líquid. Es van preparar un mínim de dos tubs eppendorf, un per a l'extracció d'ARN i l'altre per la de proteïna o altres estudis posteriors.

3.8.2 Extracció d'ARN total

Es va realitzar l'extracció d'ARN total de les mostres afegint 1 ml de reactiu TRizol® (*Invitrogen*) per cada 50-100mg de cada mostra, fent passar tota la mostra amb el TRizol a través de xeringues de diferent calibre fins que passés tot per la xeringa més estreta (de 27G, de *BD Microlance™ 3*) i sense dificultats. Es va centrifugar a 12.000G durant 10 minuts a 4°C per eliminar el material biològic no desitjat, per, a continuació, agafar el sobrenedant sota campana i deixant-se a temperatura ambient 5 minuts.

Tot seguit es va fer la separació per fases. Es va afegir 200µl de cloroform per cada ml de Trizol sota campana, es va sacsejar el tub durant uns segons i es va deixar reposar un parell de minuts a temperatura ambient. Es va centrifugar a 12.000G durant 15 minuts a 4°C per crear les tres fases on es trobava el sobrenedant que contenia l'ARN total, la interfase que contenia l'ADN i la fase inferior que contenia els productes utilitzats amb les proteïnes.

A continuació es va procedir a fer el traspàs d'ARN a columnes del kit *RNeasy® Micro Kit* de *Qiagen*. Primer es va agafar el sobrenedant, es va col·locar en un altre tub, calculant el volum, i s'hi va afegir el mateix volum d'etanol al 70%. Després de vortexar-ho per barrejar, es va traspassar 700µl de la mostra a una columna *Qiagen*, que contenia un

filtre, col·locada sobre un tub col·lector. Es va centrifugar a 10.000rpm 15 segons i descartar el filtrat. Si el volum de la mostra excedia de 700µl, es feia el mateix amb el volum restant.

Un cop l'ARN s'havia traspasat al filtre de la columna, calia fer la neteja de l'ARN amb DNAsa, per tal d'eliminar les possibles restes d'ADN. Es van rentar les columnes amb les solucions tampó del kit i es va centrifugar després de cada rentat. A continuació s'hi va afegir DNAsa a la membrana sílica-gel de la columna, deixant-la actuar 15 minuts.

Després es va netejar l'ARN amb les solucions tampó i etanol, seguint el protocol del kit. Finalment, es va fer l'elució final de l'ARN, on es substituïa el tub col·lector per un tub identificat i es va afegir el volum desitjat d'aigua RNAsa free sobre la membrana sílica-gel, on es trobava adherit l'ARN. Es va centrifugar a màxima velocitat durant un minut, i el que es va obtenir al tub és l'ARN diluït.

Per acabar, es va quantificar mitjançant el *Nanodrop* amb absorbàncies de ràtio 260/280, la qual havia d'estar al voltant de 2.

3.8.3 Microarrays d'expressió

L'estudi d'expressió es va portar a terme al Parc Científic i Empresarial de la UMH, Elx (Alacant), a Bioarray S.L. Les mostres analitzades van ser de 4 animals placebo i 4, tractats amb 17β-Estradiol.

3.8.4 Anàlisi bioinformàtic

Les dades obtingudes de l'estudi per microarrays va ser processada amb el *software* Agilent Feature Extraction v10.7. L'anàlisi bioinformàtic va ser realitzat a Bioarray S.L. amb Bioconductor utilitzant els paquets d'anàlisi: limma, Marray, pcaMethods, GOstats, RankProd i GSEABase. Abans de l'anàlisi, els punts marcats per estar fora de rang van ser filtrats i retirats. Les dades no processades van ser normalitzades amb el mètode normexp implementat al Limma i normalitzat amb quantils. Els gens diferencialment expressats van ser identificats per dos anàlisis:

- En el primer anàlisi, les dades normalitzades es van ajustar a un model lineal i a un model bayesià empíric a fi d'extreure els gens amb expressió diferencial significativa, realitzant un test paramètric, Limma. Al fer-ho, es van eliminar les sondes control per a la construcció del model. D'aquesta forma, es va construir la matriu de disseny, es va extreure el contrast d'interès i es va obtenir el llistat de gens amb expressió diferencial amb un p-valor ajustat inferior a 0,05 (95% de confiança estadística).
- En el segon anàlisi, les dades van ser analitzades utilitzant un mètode no-paramètric conegut com a rang de productes (RankProd). El que fa és crear un rànquing d'expressió de gens considerant com a fiables aquells que apareixen de forma consistent en les posicions altes del rànquing, independentment de que hi hagi certa variabilitat en els seus valors d'expressió entre les mostres. Aquest anàlisi és més adequat quan es tenen dades sorolloses o amb certa variabilitat biològica.

Finalment, els gens infra i sobreexpressats van ser classificats en termes d'ontologia utilitzant GOSTats.¹³¹

3.9 Comprovació de l'expressió gènica diferencial

3.9.1 Retrotranscripció (RT-PCR)

Aquesta tècnica consisteix en transcriure l'ARN obtingut en cDNA, i es va realitzar utilitzant SuperScript™ III RT de *Invitrogen (ThermoFisher Scientific)*. La reacció va tenir lloc en un termociclador que ja s'havia programat prèviament amb les temperatures i els temps necessaris per fer cada incubació i continuar amb el procediment.

Primer es van preparar els components en un tub, que eren 1µl dels *random primers* i/o oligodT, 3µl de l'ARN de la mostra (pot variar en funció de la concentració de la mostra, ha de ser entre 10pg i 5µg d'ARN total), 1 µl de la mix de dNTPs i aigua estèril fins a arribar als 13µl. Es va incubar al termociclador a 65°C durant 5 minuts i es va recollir els tubs en gel durant un minut. Després es van afegir els components següents, 4µl de tampó 1X First Strand, 1µl de 0,1M DTT, 1µl de RNaseOUT™ (inhibidor recombinant de RNases) i 1µl d'enzim SuperScript™ III RT i es va barrejar bé. Finalment es va tornar al

termociclador a 25°C durant 5 minuts, i es va deixar per acabar els altres cicles a 50°C durant 50 minuts, i a 70°C durant 15 minuts més, per inactivar la reacció.

3.9.2 PCR a temps real (qPCR)

Amb aquest mètode es pretenia quantificar l'expressió de diferents gens, analitzant el resultat que s'obté en cada cicle, a temps real. Es va realitzar en una placa de 96 o de 384 pous (*Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific*), per això és recomanable fer una plantilla abans de començar, per saber què anirà a cada pou.

Per dur a terme la reacció es va utilitzar SybrGreen (*ThermoFisher Scientific*), que és un colorant fluorescent no específic que s'associa amb l'ADN, pel que la fluorescència emesa és proporcional a la quantitat de còpies noves formades de l'ADN. L'anàlisi segueix el mètode ddCt¹³².

Primer es van diluir les mostres de cDNA amb aigua esterilitzada, ja que cada mostra es va fer per duplicat o triplicat, per fer una mitja i descartar valors poc concloents. Es van posar 2µl de la mostra a cada pou per les plaques de 96 pous i 1µl per les de 384. A més, es va afegir una mostra addicional per amplificar un gen control, l'expressió del qual és ubiqua i no variava en les diverses condicions a comparar. D'aquesta manera, es van normalitzar els valors per la quantitat d'ARN total de cada mostra.

A continuació es va preparar la barreja corresponent per a cada gen, que contenia les proporcions representades a la següent taula:

Taula 9: Quantitat de reactius afegits a cada pou.

96 pous (25µl totals)	384 pous (10µl totals)
2µl ADNc	2µl ADNc
1µl primer Fw ^A	1µl primer Fw ^A
1µl primer Rv ^B	1µl primer Rv ^B
12,5µl Sybr Green	5µl Sybr Green
8,5µl Aigua destil·lada	1µl Aigua destil·lada

(A) *Primer Forward (Fw)* en cadena 5'. (B) *Primer Reverse (Rv)* en cadena 3'.

Finalment es va tapar la placa amb una tapa transparent d'un sol ús, es va fer una centrífuga i es va analitzar amb l'aparell de PCR a temps real corresponent, ABI PRISM® 7000 (per la placa de 96 pous) o ABI PRISM® 7900 (per la placa de 384 pous) (*Applied Biosystems*) on es va aplicar el programa universal de qPCR. Els *primers* (taula 10) usats van ser extrets de les bases de dades qPrimer Depot o Primerbank i sintetitzats a *StabVida*.

Taula 10: *Primers* usats per la quantificació de l'expressió dels gens d'interès en ratolí.

Gen d'interès	<i>Primers</i> ^A	Gen d'interès	<i>Primers</i> ^A
NGFR (p75)	Fw CTCAGATGAAGCCAACCAG Rv GGGCGTAGACCTTGTGATCC	SERCA2a	Fw GGTCAGGGACAGGGTCAGTA Rv CTGGTGATATAGTGGAAATTGCTG
Drp2	Fw ATTCACAGAGGCAGCCTAGC Rv AGACCAACTGTGGAGCATCA	Bax	Fw TGAAGACAGGGCCTTTTTG Rv AATTCGCCGAGACTCG
Wisp2	Fw CTCAGGTTTGAAGCTGGCTC Rv GCTGGGCATACACCATTGAGA	Bcl2	Fw ATGCCTTTGTGGA ACTATATGGC Rv GGTATGCCACCCAGAGTGATGC
MMP-9	Fw CTGGACAGCCAGACTAAAG Rv CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG	ER α	Fw CCTCCCGCCTTCTACAGGT Rv CACACGGCACAGTAGCGAG
NGF	Fw AGCTTTCTATACTGGCCGCA Rv TCTCCTTCTGGGACATTGCT	ER β	Fw CTGTGCCTCTTCTCACAAGGA Rv TGCTCCAAGGGTAGGATGGAC
TrkA	Fw TCAAGCGCCAGGACATCATT Rv TTGACAGCCACGAGCATCTT	IGF1	Fw CTGGACCAGAGACCCTTTGC Rv GGACGGGGACTTCTGAGTCTT
Bdnf	Fw TGAGTCTCCAGGACAGCAAA Rv GACGTTTACTTCTTTCATGGGC	MyoD1	Fw CCACTCCGGGACATAGACTTG Rv AAAAGCGCAGGTCTGGTGAG
Ntf3	Fw CGGATGCCATGGTTACTTCT Rv AGTCTTCCGGCAAACCTCTT	Myog	Fw GAGACATCCCCCTATTTCTACCA Rv GCTCAGTCCGCTCATAGCC
Ntf4/5	Fw TCCTCACTCTGGGACTGGG Rv AGCCGGGGGAGCAGAGAAG	Mstn	Fw AGTGGATCTAAATGAGGGCAGT Rv GTTCCAGGCGCAGCTTAC
Ryr1	Fw GTGGGTTCAGAAAGCAAAG Rv CGAGGACGAGGTCCAGTTT	Pax7	Fw TCTCCAAGATTCTGTGCCGAT Rv CGGGTTCTCTTCTTATACTCC
SERCA1a	Fw AGCCAGTGATGGAGAACTCG Rv AGACCCTGGGCTGTACCTCT	GAPDH ^B	Fw AGGTCGGTGTGAACGGATTTG Rv TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
S18 ^B	Fw AGGGTTCGATTCCGGAGAGG Rv CAACCTTAATATACGCTATTGG		

(A) *Primer* utilitzats amb orientació 5'→3'. (B) Gen control utilitzat per la quantificació real de les mostres.

3.10 Anàlisi proteic

3.10.1 Extracció de proteïnes

El primer pas és comú a l'extracció d'ARN, la trituració del múscul quàdriceps o diafragma en el cas dels ratolins o d'una porció de biòpsia en el cas de les mostres humanes. Tot el procés té lloc en gel i es va realitzar afegint tampó de lisi RIPA (preparat a partir de Trizma Base, Clorur de sodi, SDS, NP-40 i àcid deoxicòlic) amb inhibidors de proteases (*Thermo Scientific*) i inhibidors de fosfatases (*Roche*). Es va afegir a raó de 200µl per cada 50mg de teixit. Tot seguit, es va fer passar a través de xeringues de diferents calibres fins que passés tot per la xeringa de calibre més petit i sense dificultats, i es va col·locar en un agitador a la cambra freda (a 4°C) tota la nit (O/N). Al dia següent es van centrifugar les mostres durant 10 minuts a 4°C i a 13.000 rpm, i es va recollir el sobrenedant en un tub nou.

3.10.2 Quantificació de proteïnes

Es va portar a terme mitjançant la creació d'una recta patró amb BSA, utilitzant el DC Protein Assay kit de *Biorad*, seguint les instruccions de la casa comercial i es va llegir l'absorbància a 750nm.

3.10.3 Anàlisi per electroforesi de proteïnes

3.10.3.1 Preparació de les mostres

Les mostres, mantingudes en gel, es van preparar segons la concentració que desitgem, que normalment és de 20µg de proteïna per mostra i pou, diluint-les amb RIPA amb inhibidors de proteases i fosfatases. Després s'hi va afegir tampó de càrrega (Laemmli buffer TRIS 250mM (pH 6.8), 6,5ml TRIS 1M (pH 6.8), SDS 10% , Bromophenol blue 0,5%, Glicerol 50% i β-mercaptoetanol en el moment d'utilitzar-lo), es van desnaturalitzar les mostres durant 5 minuts a 95°C i es van passar ràpidament al gel.

3.10.3.2 Tècnica del Western Blot

Per dur a terme aquesta tècnica es van utilitzar dos tipus de gels desnaturalitzants d'acrilamida per a la separació de les proteïnes:

- Per proteïnes de pes molecular molt elevat, i que permeti l'ús d'una proteïna de més baix pes com a marcador de càrrega, es van utilitzar gels de gradient comercials (Mini-Protean® TGX™ Gels 4-15% de *Biorad*).
- Per proteïnes de pes molecular més petit, es van preparar gels d'acrilamida de percentatge variable (depenent de la mida de la proteïna a detectar), seguint les instruccions de les receptes tradicionals. Aquests gels tenen dues parts: resolving i stacking, que són preparats amb bis-acrilamida, aigua, tampó Tris 1.5M (pH=8.8) pel *Resolving* o tampó Tris 0,5M (pH=6.8) per l'*Stacking*, 10% SDS, 10% persulfat d'amoni (APS) i tetrametiletilè diamina (TEMED).

El gel es va córrer en tampó d'electroforesis (24mM Tris base, 191mM glicina i 3,4mM SDS) a 100V constants durant, aproximadament, 1 hora i mitja, en una cubeta i font d'alimentació PowerPac300 (*BioRad*). A continuació, el gel es va transferir a una membrana PVDF (*ThermoScientific*), en una cubeta de transferència (*BioRad*), mantinguda en gel i/o a la cambra freda (4°C), amb tampó de transferència (24mM Tris base, 200mM glicina i 20% de metanol) a 400mA constants durant 1 hora (si les proteïnes són de baix pes molecular o és un gel comercial) o 3 hores (si són d'alt pes molecular). A l'acabar la transferència, es van tenyir les membranes amb Ponceau (*Sigma Aldrich*), per comprovar la correcta transferència i es va eliminar la tinció rentant les membranes amb aigua destil·lada.

A continuació, es va bloquejar la membrana amb llet descremada (*Difco*) al 5%, diluïda en PBS-T, durant 1 hora en agitació constant i a temperatura ambient. Després, es van realitzar tres rentats de 5 minuts de les membranes en PBS-T i es van incubar les membranes amb l'anticòs primari específic per la detecció de la proteïna d'interès, diluït en PBS-T, durant tota la nit (O/N), a la cambra freda (4°C) i a la nòria.

Un cop la membrana s'havia incubat amb l'anticòs primari, es va rentar tres vegades durant 5 minuts amb PBS-T i es va incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa de rave picant (HRP), diluït en llet al 5% en PBS-T durant 1 hora a temperatura ambient. A la taula 11 s'hi llisten els anticossos primaris i secundaris utilitzats.

Taula 11: Anticossos utilitzats per WB al llarg dels experiments.

Anticòs	Hoste	Casa comercial	Dilució
p75 ^{NTR}	conill	07-476 - Millipore	1:1000
Ryr1	ratolí	ab2868 - AbCam	1:2000
PAX7	ratolí	Pax7 – Developmental Studies Hibridoma Bank	1:10
MyoD	conill	sc-760 - Santa Cruz	1:100
Dysl	ratolí	NCL-DYS1 - Novocastra	1:250
CypA ^A	conill	BML-SA296 – Grupo Taper	1:10.000
α -ratolí HRP	conill	P0260 - Dako	1:5000
α -conill HRP	cabra	P0448 - Dako	1:5000

(A) Anticòs de la proteïna utilitzada com a control de càrrega.

La membrana es va revelar durant 5 minuts amb la solució Western BrightECL (*Advansta*), substrat de la reacció d'HRP. Aquesta reacció és quimioluminescent, pel que depenent de la quantitat d'HRP que hi hagi a la membrana, es generarà més o menys llum. Els revelats es van visualitzar mitjançant l'exposició de films (Medical X-Ray films blue, *ThermoFisher Scientific*) i/o amb l'aparell Odissey Fc i es van quantificar els nivells de la proteïna estudiada i del control de càrrega amb el software d'*ImageJ 1.6* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).

3.11 Anàlisi per immunofluorescència

Per identificar la localització de les proteïnes d'interès es va utilitzar la immunofluorescència en les seccions histològiques de múscul murí o humà (proveïts pel Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron).

El protocol estàndard que es va utilitzar per la tècnica d'immunofluorescència consistia en:

Deixar atemperar durant 15 minuts els portaobjectes a temperatura ambient i es van envoltar les seccions amb DAKO pen (*Dako*) per emmarcar-los d'una pel·lícula que repel·leix els líquids. Es van fixar les seccions de teixit amb paraformaldehid al 2% durant 5 minuts i a continuació, es va procedir a la permeabilització amb PBS1X:Tritó 0,1%

durant 20 minuts.. Amb el tritó s'aconsegueix digerir les membranes de les cèl·lules per permetre una millor exposició de les proteïnes.

Seguidament s'incubaren les seccions durant 1 hora amb una solució bloqueig composta de 5% d'albumina de sèrum boví (BSA) i el 5% de sèrum de cabra dissolta en PBS1X:Tritó 0,1%. Seguidament es va incubar amb l'anticòs primari a la dilució determinada segons la casa comercial o experiència prèvia, dissolta en solució de bloqueig i es va deixar incubar un temps variable en funció de l'anticòs utilitzat (taula 12).

Taula 12: Anticossos utilitzats per IF.

Anticòs	Hoste	Casa comercial	Dilució
NGFR (p75)	conill	07-476 - Millipore	1:100
Utrofina	ratolí	NCL-DRP2 - Novocastra	1:100
Distrofina	conill	ab15277 - AbCam	1:100

A continuació es van rentar amb la solució de PBS1x:Tritó 0,5% durant 10 minuts tres vegades per eliminar l'excés d'anticòs i seguidament es van incubar amb l'anticòs secundari marcat amb fluorescència, normalment α -mouse (Alexa Fluor® 594 goat anti-mouse IgG *ThermoFisher Scientific*) i α -rabbit (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG o Alexa Fluor® 594 goat anti-mouse IgG, *ThermoFisher Scientific*), a una dilució de 1:500, durant una hora i a les fosques per mantenir la fluorescència.

Seguidament es van tornar a fer 3 rentats de 10 minuts i finalment es van muntar el cobreobjectes, aplicant abans un parell de gotes de *Vectashield Mounting Medium amb DAPI (Vector Laboratories)* per tenyir els nuclis, i es va segellar el cobreobjectes. Les imatges van ser capturades amb un microscopi confocal a 20X augments.

Sempre s'ha de fer un control d'anticossos secundaris de les immunofluorescències, és a dir, en algunes seccions es va posar només anticòs secundari o cap anticòs, per veure si hi ha alguna reacció creuada, marcatge inespecífic o autofluorescència.

3.12 Anàlisi estadístic

Per analitzar els resultats i comparar les possibles diferències entre grups es va tenir en compte si segueixen una distribució normal o no, utilitzant el test Kolmogorov-Smirnov quan el nombre de valors registrats (n) era superior a 30 i el test de normalitat Shapiro-Wilk quan la n era inferior a 30. Aquests tests també proporcionen dades com la mitja, la mitjana, la desviació estàndard i el rang interquartílic. La normalitat de la variable determinarà el test a utilitzar a continuació, paramètric (variables normals) o no paramètric (variables no normals).

Els experiments realitzats van consistir en la comparació d'una variable categòrica i una variable continua, en dues o més de dues categories, pel que si totes les variables segueixen una distribució normal es van realitzar els tests paramètrics: *unpaired t-test* o ANOVA d'una via amb el test de comparació múltiple de Tukey. Però si alguna variable no seguia una distribució normal, llavors s'aplicaven els tests no-paramètrics: Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis amb el test de comparació múltiple de Dunn.

La representació dels resultats es va realitzar indicant la mitjana +/- la desviació estàndard en el cas de les variables normals, i la mediana juntament amb el rang interquartílic per a les variables no normals. A les gràfiques l'estadística es descriu en funció del p valor resultant del test utilitzat en cada cas, sent: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$.

Els anàlisis es van realitzar utilitzant el *software* Graphpad Prism 7.

3.13 Diagnòstic molecular

3.13.1 Diagnòstic clínic

El laboratori on s'ha realitzat aquesta tesi està associat al Servei de Neurologia Pediàtrica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón. Aquest servei porta el seguiment de pacients amb malalties rares i complexes, moltes de les quals precisen d'un diagnòstic acurat per a poder oferir una atenció personalitzada, un pronòstic, opcions terapèutiques i consell genètic familiar en cas de ser requerit. És per això que, en els últims anys s'han introduït les tècniques de NGS per l'estudi de les causes genètiques d'aquestes patologies i més concretament, dels trastorns neuromusculars pediàtrics (NMD).

Prèviament a l'aplicació de les tècniques de NGS, cal de la intervenció de moltes disciplines que ajuden a dirigir el diagnòstic. Es tenen en compte: la història clínica familiar, el fenotip del pacient, la progressió de la malaltia, els resultats analítics, les troballes de l'electromiograma, el patró d'afectació de determinats grups musculars a la ressonància magnètica i les dades que proporciona la biòpsia muscular. Tota aquesta informació en conjunt pot dirigir-nos cap a un gen o grup de gens concret.

A la taula 13, es recullen les dades clíniques dels 38 pacients analitzats en aquest treball i els gens candidats als que ens dirigeix el diagnòstic clínic, ordenats per patologies.

Taula 13: Recull de dades clíniques dels pacients analitzats.

Pacients	Trets clínics característics	Evolució	Antecedents familiars	CK	Informe EMG	Informe AP	Informe RM	Gens candidats
1	Hipotonia congènita. Retard motor. Ptosis. Debilitat facial i proximal > distal. Amiotròfia. Areflèxia. Afectació musculatura respiratòria.	Empitjorament primers anys de vida, després estabilitat	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents	Normals	Miogen	Miopatia centronuclear	Atròfia muscular progressiva bilateral i simètrica afectant musculatura facial, avantbraç, paravertebral lumbar, gluti major, cuixes i compartiment anterior cama	MTM1, BIN1, RYR1, DNM2, TTN
2	Hiperlaxitud distal lleu, debilitat proximal cintura escapular y pèlvica moderada, deambulació independent, lleu hipomomia.	Estable	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Miogen	Desproporció tipus de fibres	Infiltració grassa predominant a gluti major i tensor fascia laxa.	No és possible orientació diagnòstica
3	Hipotonia y debilitat generalitzada. Atròfia muscular generalitzada. Balanç articular lliure i indolor. Disminució de força muscular de predomini proximal.	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Miogen	Predomini de fibres tipus 1. Signes de denervació greu i reinervació secundària	Lleu atròfia gluti bilateral amb lleu infiltració grassa.	No és possible orientació diagnòstica
4	Inici promers dies de vida amb debilitat facial, axial i d'extremitats, paladar ojival, alteració de la deglució i insuficiència respiratòria per microaspiracions. Posteriorment estat mental normal, debilitat facial, proximal i distal d'extremitats.	Estable	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Activitat espontània i patró miogen	Presència de cossos nemalínics	Infiltració grassa i atròfia muscular molt greu a llengua, ECM, glutis majors, quadrat femoral, tibial anterior, bessons.	TPM3, NEB, ACTA1, TPM2, TNNT1, KBTBD13, CFL2, KLHL40, KLHL41, LMOD3, MYPN

* La taula segueix a la pàgina següent.

Pacient	Trets clínics característics	Evolució	Antecedents familiars	CK	Informe EMG	Informe AP	Informe RM	Gens candidats
5	Hipotonia, debilitat axial i proximal d'extremitats des del primer any de vida. Hiperlaxitud. Insuficiència respiratòria (diafragmàtica)	Escoliosi progressiva Debilitat curs estable	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Miogen	Canvis mínims inespecífics. Fibrosi. Distorsió patró intermiofibril·lar. Variació mida fibres	Afectació severa musculatura cintura pèlvica i cuixes amb substitució grassa i pèrdua de volum	Inicialment, tots els de CM o CMD, posteriorment, SEPN1
6	Hipotonia i hiperlaxitud distal No contractures articulars. Debilitat distal a extremitats superiors i proximal a inferiors	Estable	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Miogen lleu	Miopatia <i>Central core</i> , Miopatia distal	Atròfia muscular bilateral i simètrica de cuixes i compartiment posterior de cames.	No clars
7	Estat mental normal. hipomímia facial lleu, debilitat facial, proximal i distal extremitats inferiors. No afectació respiratòria ni deglutòria.	Estable	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Miogen i destrucció muscular aguda	Miopatia nemalínica (variabilitat de la mida de les fibres, dipòsits nemalínics, nuclis centrals 10%)	Infiltració grassa bilateral i simètrica de tibial anterior, flexor comú dels dits, bessons i soli. Edema muscular a bessons. Atròfia músculs temporals.	TPM3, NEB, ACTA1, TPM2, TNNT1, KBTBD13, CFL2, KLHL40, KLHL41, LMOD3, MYPN
8	Hipotonia i debilitat des del naixement amb progressió als primers anys de vida. Hipomímia facial, ptosi, oftalmoplègia, hipotonia i debilitat axial i d'extremitats severa. Afectació respiratòria i deglutòria	Progressiu primers dos anys després estable	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Miogen i signes de destrucció muscular aguda	Absència d'infiltrat. Nuclis centrals (25-35%). Halo pà·lid subtelomèric. Variabilitat mida fibres.	Ventriculomegàlia supratentorial estable. Probable fibromatosis coli del ECM dret.	RYR1, DNM2, BIN1, MTM1

Pacients	Trets clínics característics	Evolució	Antecedents familiars	CK	Informe EMG	Informe AP	Informe RM	Gens candidats
9	Fenotip coincident amb el dèficit de Ryr1	Progressió lenta	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Mostra enviada des de l'Hospital de Sant Pau			RYR1
10	Hiperlaxitud, ptosi, paladar ojival, transtorn masticació i debilitat lleu estable.	Empitjorament primers anys de vida, després estabilitat	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Miogen	Variabilitat mida de fibres. Nuclis centrals freqüents.		RYR1, MTM1, DNM2, BIN1- No clars
11	Fenotip coincident amb un dèficit de Ryr1	Progressiu	Pares sans. Consanguinitat	Normals, ocasionalment elevades	Mostra enviada per la Dra. Quijano.			RYR1
12	Hipotonia congènita, debilitat i hiperlaxitud articular i ptosis. Apnees neonatals i múltiples infeccions respiratòria	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Normals, ocasionalment elevades	Miogen	Miopatia centronuclear	Atròfia difusa i infiltració grassa bilateral i simètrica afectant musculatura: facial, paravertebral, glutis, cuixes i cames	RYR1

* La taula segueix a la pàgina següent.

Pacients	Trets clínics característics	Evolució	Antecedents familiars	CK	Informe EMG	Informe AP	Informe RM	Gens candidats
13	Hipotonia i debilitat axial i de cintures. Hiperlaxitud marcada. atrofia muscular. Peus varos.	Empitjorament primers anys de vida, després estabilitat	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Miogen amb signes de destrucció muscular aguda	Nuclis centrals	Ventriculomegàlia dismòrfica supratentorial valvulada. Chiari 1. Augment massa intermitja, defecte parcial falç cerebral. Discretes lesions encefalomalàctiques periventriculars, corones radiades i nuclis dentats. Atròfia i infiltració grassa muscular, sobretot glutis majors, semitendinos, sartori, gracilis, adductors majors i extensor comú dels dits	DES, CRYAB,TTN
14	Hipotonia axial, i paladar alt. Fenotip peculiar (retrognatia, arrel nasal plana, Implantació baixa orelles amb alteració plec lòbul i lleu desviació comisura bucal a l'esquerra durant el plor).	Inicialment progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Miogen	Presència de nuclis centrals	Discreta atròfia de pterigoidals laterals, bíceps braquial, compartiment anterior de l'avantbraç, paravertebral lumbar, gluti, vast intern, cap llarg del bíceps femoral.	DNM2, MTM1, BIN1, RYR1
15	Microcefàlia. Bona comprensió, vocabulari escàs, algun bisílab, ptosis, no oftalmoplegia, boca oberta, paladar alt amb hipertrofia, hipotonia axial i perifèrica, no contractures articulars, areflèxia i masses musculars toves. Desplaçament reptant, s'aixeca amb ajuda.	Empitjorament primers anys de vida, després estabilitat	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Miogen	Normal	Infiltració grassa dels pterigoidals. Edema del centre del vas lateral, bíceps i compartiment posterior.	Tots els de CM i CMD. Revisió primer de DNM2, després dels relacionats amb M. Nemaínica.
16	Hipotonia generalitzada, amiotròfia, debilitat axial i proximal d'extremitats.	Debilitat diafragmàtica (VNI). Escoliosis	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Miogen	Variabilitat mida fibres	Atròfia musculatura paravertebral, compartiment posterior cuixes i panxells. Absència de m. sartori	SEPN1

* La taula segueix a la pàgina següent.

Pacients	Trets clínics característics	Evolució	Antecedents familiars	CK	Informe EMG	Informe AP	Informe RM	Gens candidats
17	Debilitat axial i proximal d'extremitats Hiperlaxitud distal amb contractures articulars proximals. Debilitat de musculatura respiratòria	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Miogen	Variabilitat mida fibres, predomini fibres tipus I, fibrosis i nuclis centrals ocasional	Afectació muscular generalitzada i simètrica amb pèrdua de volum muscular i marcats signes de substitució grassa. Signe de <i>roller cake</i>	COL6A1, COL6A2, COL6A3
18	Debilitat proximal d'ambues cintures, de predomini a cintura pelvica i a compartiment posterior de membres superiors	Lentament progressiu	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Miogen	Variació de la mida de les fibres, nuclis centrals, fibrosis endomisial moderada	Atròfia muscular i infiltració grassa bilateral i simètrica destacant preservació de l'extrem distal del psoas i dels músculs obturatrius i priforme. Bandes radials i verticals a deltoïdes i tríceps.	COL6A1, COL6A2, COL6A3
19	Debilitat proximal de cintures, d'inici a la primera decada, lleu hipomímia facial i debilitat orbiculars.	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Miogen amb signes de destrucció muscular aguda	Variació mida de les fibres. Fibres petites angulars amb molta coloració per menadiona i ATPasa.	Afectació muscular difusa amb distribució pervejada simètrica. A les EEl afectació isquiotibials amb preservació parcial del quàdriceps, sartori i adductors.	Tots els gens associats a LGMD
20	Hipotonia i debilitat de predomini axial.	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Miogen amb destrucció muscular aguda	Absència de merosina	Discreta atròfia bilateral i simètrica de gluti mig, recte anterior, adductor major, semitendinós i més greu a peroneal i solis. Edema deltoïdes i tríceps.	LAMA2

* La taula segueix a la pàgina següent.

Pacients	Trets clínics característics	Evolució	Antecedents familiars	CK	Informe EMG	Informe AP	Informe RM	Gens candidats
21	Hipotonia, hiperlaxitud, debilitat muscular i retràs motor	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Miogen	Distròfia muscular	Normal	COL6A1, COL6A2, COL6A3
22	Debilitat i alteració de la marxa.	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Miogen	Distròfia muscular	Discreta infiltració adiposa dels músculs subescapulars, gluti major i mig, quàdriceps, semitendinos, cap llarg del bíceps femoral, adductor major i de compartiment lateral i posterior de cames.	COL6A1, COL6A2, COL6A3
23	Debilitat distal progressiva d'EELI. Hiporeflèxia	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Elevades	Miogen amb signes de destrucció muscular aguda	Infiltració adiposa, atròfia i fibrosis. Variabilitat mida fibres.	Afectació muscular bilateral i simètrica que afecta pràcticament tots els grups musculars, més severa a nivell de cintura pèlvica i part proximal de cames on s'observa severa substitució grassa	Gens relacionats amb LGMD.
24	Debilitat de cintures	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Elevades	Fet a un altre centre, no informes	Distròfia muscular	Atròfia muscular difusa, bilateral i simètrica a musculatura del coll, cintura escapular, braços, costelles, paravertebral i glútia (preservació de sartori i gracilis) i cames (predomini posterior i lateral). Ede,a muscular moderat.	Gens relacionats amb Distròfies de cintures.

* La taula segueix a la pàgina següent.

Pacients	Trets clínics característics	Evolució	Antecedents familiars	CK	Informe EMG	Informe AP	Informe RM	Gens candidats
25	Lleu debilitat d'extremitats. Hipertròfia bessons.	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Elevades	Miogen i neurogen	Canvis distròfics. Predomini fibres tipus 1. Reducció de caveolina i absència de calpaïna.	Afectació dels músculs: bessons interns, glutis majors, paravertebrals, pectorals i dorsals amples.	No clars
26	Debilitat de cintures (pèlvica>escapular)	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Elevades	Miogen	Dèficit de marcatge per distrofina tipus 2	Atrofia muscular de predomini a la cintura escapular, pectoral menor, paravertebral lumbar, transversos, glutis i cuixes	Gens relacionats amb LGMD.
27	Hipotonia generalitzada, pseudohipertròfia de bessons, retracció aquília bilateral, Gowers positiu	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Elevades	Miogen	Gran fibrosi endomisial i infiltració adiposa	Substitució adiposa de la musculatura paravertebral, pèlvica i cuixes, preservant abdominal i bessons	Gens relacionats amb LGMD.
28	Debilitat de cintures	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Elevades	Miogen	Presència de nuclis centrals (6%)	Normal	Gens relacionats amb LGMD.

* La taula segueix a la pàgina següent.

Pacients	Trets clínics característics	Evolució	Antecedents familiars	CK	Informe EMG	Informe AP	Informe RM	Gens candidats
29	Hiperckèmia asimptomàtica	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat. Germana bessona amb la mateixa simptomatologia	Elevades	Miogen	Alteracions miopàtiques. Expressió disminuïda de distrofina 3, sarcoglicà delta i merosina.	Normal	No clars
30	Laringomalàcia greu període neonatal, retard motor, debilitat amb períodes d'empitjorament	Progressiu fins a inici del tractament	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Alteració de la transmissió neuromuscular	No	No	Gens associats amb miastènies congènites
31	Hipotonia i debilitat congènita severa. Insuficiència respiratòria (VMI)	Progressiu	Pares sans. Consanguinitat	Normals	Neuropatia sensitivo-motora molt desmielinitzant	NO	Atròfia cerebel bilateral amb preservació del vermis i del tronc de l'encèfal. Dubtosa atròfia optoquiasmàtica i dels ganglis de la base. Discreta ventriculomegàlia supratentorial i retard del patró de mielinització supratentorial/hipomielinització. No atròfia muscular a EEII	No clars
32	Atrofia generalitzada, debilitat distal a EESS i proximal i distal a EEII.	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Polineuropatia axonal sensitivo-motora	NO	No (RM cerebral normal)	No clars

* La taula segueix a la pàgina següent.

Pacients	Trets clínics característics	Evolució	Antecedents familiars	CK	Informe EMG	Informe AP	Informe RM	Gens candidats
33	Insensibilitat al dolor. Hipopalestèsia bilateral I>D, sensi bilitat propioceptiva i tàctil normal. Areflèxia i anhidrosi	Inicialment progressiu, després estable	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Neuropatia sensitivo- axonal amb afectació de fibra fina	No	No	Gens associats amb insensibilitat al dolor i anhidrosi.
34	Aquinesia fetal. Artrogriposis distal. Hipotonia. Amioplàsia d'extremitats. Arreflexia. Absència de marxa autònoma.	Estable	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Miogen	Infiltració adiposa i fibrosis endomisial. Fibres petites i variabilitat en la mida de les fibres.	Substitució grassa de la musculatura de les extremitats preservant sartori, adductor llarg i gracilis i parcialment psoas y tibial anterior	No és possible orientació diagnòstica
35	Artrogriposis distal, contractures proximals i distals, espina rígida, escoliosis, amiotròfia, areflèxia, debilitat facial, anquilosis temporo- mandibular, paràlisis supraversió de la mirada.	Estable. Escoliosis	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Normal	Predomini fibres tipus 1	Atròfia muscular difusa bilateral i simètrica de la musculatura de la cintura escapular i pèlvica, paravertebral de predomini lumbar, glútia i de forma moderada regions posteriors de les cames	No és possible orientació diagnòstica

* La taula segueix a la pàgina següent.

Pacients	Trets clínics característics	Evolució	Antecedents familiars	CK	Informe EMG	Informe AP	Informe RM	Gens candidats
36	Artrogriposis i hipotonia	Progressiu	Pares sans. Consanguinitat, germà afecte i mort	Normals	Pèrdua axonal aguda severa	No	Atròfia i infiltració grassa de la musculatura paravertebral lumbar, glutis, sartori, gracilis, compartiment posterior cames sobretot solis i peus.	No clars
37	Atrofia muscular generalitzada severa, debilitat musculatura flexora i extensora del coll, paravertebral, musculatura proximal i distal de membres superiors i inferiors. Arreflexia. Hiperlaxitud dits i contractura colzes i retraccio aquilia.	Progressiu	Pares sans. No consanguinitat. No antecedents.	Normals	Miogen	Variabilitat mida fibres, nuclis centrals, fibrosis lleu, dipòsit lipídic intersticial i fibres vaquolades	Atrofia muscular difusa coll, avantbraços, cintura escapular, paravertebral, intercostal, paret abdominal, glútea, cuixes i cames, sense edema muscla. No edema.	No és possible orientació diagnòstica
38	Retard global, ptosis bilateral, síndrome dismòrfic, trastorn conductual, debilitat flexors cervicals	Estable	Pares sans. No consanguinitat	Normals	Normal	No	No	No clars

3.13.2 Diagnòstic genètic

Les proves realitzades per cada pacient es recullen a la taula 14.

Taula 14: Relació de pacients i patologies analitzades per NGS.

Pacient	Trastorn neuromuscular	Tècnica de NGS	Pacient	Trastorn neuromuscular	Tècnica de NGS
1	CM ^A	WES ^D /TSO ^E	20	CMD	TSO
2	CM	WES/R ^F	21	CMD	TSO
3	CM	WES/TSO/R	22	CMD	TSO
4	CM	WES/TSO/R	23	LGMD ^C	TSO
5	CM	WES	24	LGMD	TSO
6	CM	TSO/R	25	LGMD	TSO/R
7	CM	TSO	26	LGMD	TSO/R
8	CM	TSO	27	LGMD	TSO
9	CM	TSO	28	LGMD	TSO
10	CM	TSO/R	29	LGMD	TSO/R
11	CM	TSO	30	Miastènia congènita	TSO
12	CM	TSO	31	Neuropatia	TSO/R
13	CM	TSO/R	32	Neuropatia	TSO/R
14	CM	TSO/R	37	Neuropatia	TSO
15	CM	TSO	34	Artrogriposi	WES/R
16	CMD ^B	WES	35	Artrogriposi	WES/TSO/R
17	CMD	WES/TSO	36	Artrogriposi	TSO/R
18	CMD	WES/TSO	37	M. Vacuolar	WES/R
19	CMD	WES	38	Hipertròfia	TSO/R

(A) CM=Miopatia congènita (B) CMD=Distròfia Muscular Congènita (C) LGMD=Distròfies Muscular de Cintures (D) WES=Exoma complet (E) TSO=TruSight One (F) R=Reanàlisi

3.13.3 Extracció d'ADN de sang

Les mostres dels pacients i dels seus progenitors es van rebre al laboratori de Neurologia Pediàtrica de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron (VHIR) on es va procedir a realitzar l'extracció d'ADN seguint el protocol estàndard *salted out*, que es va dur a terme en diverses etapes.¹³³

La primera d'elles és la lisis d'eritròcits que es va produir afegint a la sang una solució composta per Tris 2M, MgCl₂ 1M i Aigua MiliQ homogeneïtzant la mostra, es va centrifugar a 3.500rpm a 4°C durant 15 minuts i es va repetir el procés dos cops. El sobrenedant es va descartar.

El segon pas consistia en la lisis de leucòcits i obtenció dels nuclis i per això es va afegir al pellet una barreja de 3 ml de WCLB (NaCl 5M, EDTA 0,5M, Tris 2M i Aigua MiliQ), 200µl de SDS i 500µl de Proteïnasa K i es va deixar en agitació en un bany d'aigua a 37°C tota la nit.

A continuació, se li va afegir 1mL de clorur de sodi saturat a 5,5M i es va deixar reposar a 4°C durant 15 minuts. Es va centrifugar a 3.500rpm a 4°C durant 15 minuts i es va recuperar-se després per decantació el sobrenedant en un tub nou, procés que es va repetir un cop més. Amb aquest pas s'aconseguia la lisi dels nuclis.

El següent pas va consistir en eliminar les proteïnes del sobrenedant pel que s'hi va afegir el mateix volum que tenim en cloroform i es va produir la separació per fases gràcies a l'agitació i centrifugació a 3.500rpm a 4°C durant 15 minuts. La fase aquosa superior es va traspasar en un tub nou.

Llavors té lloc la primera precipitació de l'ADN que es va aconseguir mitjançant l'addició de dos volums d'etanol absolut de forma que l'ADN precipitava en forma de medusa i permetia el seu traspàs a un tub nou on es dissolia en TE (Tris 2M, EDTA 0,5M i Aigua MiliQ) una solució que ajuda a preservar l'ADN, prèvia evaporació de les restes d'etanol. L'últim pas del procés va ser guardar els tubs a -20°C durant tota la nit i centrifugar a 3.500rpm durant 10 minuts per a fer baixar les restes d'ADN. Es va decantar el sobrenedant, es va deixar assecar el pellet i es va dissoldre amb TE.

Les mostres finals es van quantificar amb el *Nanodrop* i es van emmagatzemar a -20°C fins la seva utilització.

3.13.4 Extracció d'ADN de saliva

En alguns casos, s'extreu l'ADN dels pacients a partir de la mostra de saliva amb els *kits* de la casa comercial *DNA Genotek*. La saliva es va recollir en un recipient *Oragene*[®] que contenia una solució que preserva la mostra. El primer pas per l'extracció va ser la incubació en una estufa a 50°C durant una nit.

Els següents passos van tenir lloc amb el protocol del kit *prepITTML2P*, afegint 40µl de la solució per cada mil·lilitre de saliva, es va barrejar bé i es va incubar 10 minuts en gel. Tot seguit, es va centrifugar a màxima velocitat durant 4 minuts. Es va recuperar la fase superior on hi ha el DNA dissolt i es va precipitar barrejant amb dos volums d'etanol absolut. El precipitat resultant es va recuperar, es va deixar assecat i es va dissoldre en TE.

En aquest procediment també hi ha una segona precipitació que s'obtenia de la centrifugació, decantació i dessecació de la mostra.

Igual que en el protocol d'extracció a partir de sang, les mostres resultants es van quantificar amb Nanodrop i es van emmagatzemar a -20°C.

3.13.5 Tècniques de seqüenciació massiva (NGS)

Pel diagnòstic dels pacients pediàtrics afectes de trastorns neuromuscular es van utilitzar dues aproximacions: l'Exoma complet (WES) o l'Exoma clínic (panell TruSight One, *Illumina*).

1. Exoma complet: El processament i la seqüenciació es van portar a terme al Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG) a partir de 3µg de cada mostra. El procediment emprat va consistir en la preparació de la llibreria utilitzant el kit *Illumina Truseq DNA Sample prep* i l'enriquiment amb *Roche NimbleGen SeqCap EZ EXOME v2.0_36Mb*. Finalment, la seqüenciació amb finals aparellats es va realitzar en un aparell *Illumina HiSeq 2000*. El processament de les dades crues també va ser realitzat pel CNAG alineant les lectures de seqüenciació amb la versió del genoma hg19 (GRCh37) utilitzant el *GEM Mapper* i l'alineador BFAST. Les variants van ser identificades utilitzant SAMtools i anotades amb *dbSNP ID* (NCBI) i les freqüències al·lèliques van ser extretes del projecte 1000 Genomes i

de la base de dades pròpia del CNAG. A més, les variants noves van ser anotades amb *Variant Effect Predictor (ENSEMBL)*.

- Exoma clínic: ús pel diagnòstic del panell de seqüenciació *TruSight One (Illumina)* sorgit l'any 2013. Aquest panell se centra en els 4.813 gens associats a fenotips clínics coneguts. La preparació de la llibreria va consistir en la fragmentació per part dels transposomes i addició d'adaptadors de forma simultània a 50ng d'ADN de partida. Això es va amplificar per PCR afegint uns identificadors únics per cada mostra (que ens permetien identificar-los després) i amb els que es van poder fer un *pool* de 3 o fins a 12 mostres pel següent pas, l'enriquiment. L'enriquiment va consistir en la hibridació amb sondes (oligonucleòtids marcats amb biotina) per les regions diana, els exons dels 4.813 gens. Seguit d'una captura amb boles magnètiques amb estreptavidina que es van a les sondes amb biotina per lligar només els fragments d'interès. Els últims passos van incloure la neteja dels fragments d'ADN sense lligar i l'elució i quantificació de la llibreria (figura 27).

Finalment, es va carregar la llibreria en el seqüenciador *MiSeq d' Illumina* desnaturalitzada i a una concentració de 1,2nM. Les dades crues, FASTQ es van alinear amb el genoma de referència hg19 (GRCh37) utilitzant el mètode BWA (*Burrows-Wheeler Aligner*)¹³⁴ i la identificació de variants amb GATK (*Genome Analysis Tool Kit, Broad Insitute*)¹³⁵, mitjançant el *software MiSeq Reporter d' Illumina*. Les variants genòmiques identificades es van anotar important els arxius VCF al *software VariantStudio 2.2.1 (Illumina)*.

Figura 27: Passos de la preparació de llibreries TruSight One.

Imatge extreta del protocol del TruSight One d'Illumina.



3.13.6 Anàlisi de resultats de NGS

Com que l'objectiu de l'anàlisi de variants de les tècniques de NGS va ser el diagnòstic de la patologia que presenten els pacients, es van analitzar únicament les variants identificades a gens prèviament relacionats amb la patologia específica. Es va realitzar un primer filtratge en base al llistat de gens publicats *Muscle Gene Table* (www.musclegenetable.fr), que com ja s'ha comentat anteriorment, creix en número de gens cada any pel que és necessari un reanàlisi amb el nou llistat de gens actualitzat de tots els casos que han resultat negatius en el primer anàlisi o aplicant un nou *pipeline* per processar les dades crues amb les noves actualitzacions.

Per això, el primer pas que es va realitzar quan ja tenim totes les dades de seqüenciació anotades i accessibles per poder filtrar i identificar el gen responsable, va ser descarregar el llistat de gens associat al fenotip específic que ens interessa per cada pacient. Quan el fenotip no era prou específic, un segon filtratge es va realitzar amb el llistat de tots els gens associats a trastorns neuromusculars.

A l'hora de prioritzar les possibles variants, es van tenir en compte uns paràmetres estandarditzats, com són:

1. La qualitat de la seqüenciació: informa de la fiabilitat i veracitat de les variants que s'identificaren en les dades de NGS. Són uns valors que venen especificats per cada variant i informen de: (1) la qualitat de la seqüència (normalment s'accepta un valor de $QC > 20$); (2) el nombre de lectures d'aquesta seqüència i de cada base (un valor correcte seria $DP \geq 10$); i (3) de la freqüència al·lèlica del canvi.
2. La freqüència poblacional: és essencial conèixer l'existència i freqüència dels canvis que estudiem a la població general o a la població afecta del mateix fenotip. En el cas de la població general es va recórrer a bases de dades que recullen la informació de tots els exomes realitzats en diferents projectes, de diferents parts del món i d'individus no relacionats entre ells (com: *1000 Genomes* (<http://www.internationalgenome.org>), *ExAC* (<http://exac.broadinstitute.org>) o *gnomAD* (gnomad.broadinstitute.org)^{136,137}).

I per comprovar les variants associades a determinada patologia, es van consultar bases de dades com *ClinVar* (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar), *dbSNP* (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP) o *LOVD* (www.lovd.nl)¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Per considerar una variant com a possible causant de la patologia, la seva freqüència poblacional ha de ser inferior a l'1% en cas de trastorns dominants o del 5% per a recessius, o a d'estar catalogat com a patogènic a les bases de dades específiques.

3. Efecte de la variant: es tracta de predir (en cas de que no hi hagi proves funcionals complementàries) l'efecte que pot tenir un canvi en la funció de la proteïna, amb ajuda del programa *snpEff*.¹⁴¹ Normalment tenen en compte l'impacte que genera en la pauta de lectura i es classifiquen en:
 - Variant d'alt impacte: en aquesta categoria s'hi inclouen les mutacions sense sentit (*nonsense*), mutacions *frameshift*, mutacions que afecten els llocs donadors o acceptors d'*splicing* o les que produeixen la pèrdua de la metionina d'inici de traducció.
 - Variant d'efecte moderat: canvis puntuals *missense* o canvis que generen la pèrdua del codó STOP final.
 - Variant d'efecte lleu: canvis sinònims (poden tenir algun efecte en el plegament proteic a nivell funcional o activar llocs d'*splicing* críptics, per exemple) o delecions o insercions que mantenen la pauta intacte (*in frame*).
 - Variants d'efecte modificador: són els canvis difícils d'interpretar i se'ls denomina variants de significat incert, VUS (de l'anglès, *Variant of Uncertain Significance*) i on s'inclouen canvis intrònics (*deep intronic*) i canvis en regions promotores o reguladores.
4. Finalment es va buscar més informació de les variants utilitzant altres eines com els predictors *in silico*, que mitjançant l'ús d'algoritmes prediuen quina és la probabilitat de que una variant sigui patogènica. N'hi ha un gran nombre d'eines que serveixen per canvis exònics (*Polyphen-2*, *SIFT*, *PROVEAN*, *MutationTaster*...^{142,143}) i d'altres que s'usen per variants intròniques o VUS (*HumanSpliceFinder v3.0*, *NetGene2*, *GeneSplicer*...^{144,145}). També es va recórrer a la informació de la que es disposa pel *Genome Browser* de l'*UCSC*¹⁴⁶ per comprovar paràmetres de conservació entre espècies ja que quan més elevada sigui la conservació, més possibilitats té de que si es produeix una mutació, aquesta sigui patogènica.

En el cas de sospitar d'un gen en concret, pel que no s'ha trobat res en un primer anàlisi, es va inspeccionar visualment el fitxer *bam* (obtingut de l'alineament dels arxius FASTQ amb el genoma) amb el *software IGV* (*Broad Institute*)¹⁴⁷ per a detectar regions mal cobertes, confirmar que la seqüenciació ha estat bona i que les variants que s'observen acaben de ser creïbles.

3.13.7 Validació per PCR-seqüenciació Sanger

La seqüenciació massiva permet obtenir una quantitat d'informació enorme però de moment, no és capaç d'obtenir una cobertura (quantitats de lectura d'una posició determinada) tan elevada ni tan homogènia com la seqüenciació tradicional PCR Sanger. Pel que és necessari l'ús d'aquesta tècnica per confirmar la veracitat de les variants i en el nostre cas, assegurar que el patró d'herència específic es compleix, seqüenciant als progenitors, i així augmentar la probabilitat de que sigui la causa de la patologia¹⁴⁸.

3.13.7.1 Disseny de primers

Per tal d'amplificar la regió d'interès que més tard es va seqüenciar, es van dissenyar uns oligonucleòtids a banda i banda d'aquesta regió: *primer* complementari a 5' (*forward*) i *primer* complementari a 3' (*reverse*). Al fer el disseny es va intentar que la reacció amplifiqués tot l'exó on es troba la variant més una gran part de regió adjacent, intentant que el fragment tingui una mida d'uns 500 parells de bases.

En alguns casos en els que es va fer necessària la validació de l'efecte funcional d'una variant (com en les mutacions que afecten l'*splicing* canònic), el que es va fer va ser amplificar i seqüenciar el ADNc (provinent de l'ARNm de la biòpsia), pel que els primers es van dissenyar sobre la seqüència d'ARNm.

Aquest procés es va realitzar amb l'ajuda del *software Primer3 Input*¹⁴⁹, que va proposar els millors primers per a la seqüència que se li havia aportat marcant-li la regió que interessava amplificar. La comprovació de la idoneïtat dels primers, s'analitza mitjançant els *softwares Primer-Blast*¹⁵⁰ (tant per primers genòmics com pels d'ARNm) i la PCR *in-silico* (només pels primers genòmics) del *GenomeBrowser* de l'UCSC.

Taula 15: *Primers* usats per la validació de variants en pacients amb NMD.

Gen	Pacient	<i>Primers 1a mutació</i>	<i>Primers 2a mutació*</i>
DNM2	1	Fw AAGACCCCTAGAGCCCATTC Rv CCTGAAAATGACCTGTCCTGG	
TTN	3	Fw CCAAAGGAGACAAGGAGCTAGA Rv CTGGCTACAATTGGCTCTGA	Fw TTCAGAGCCCCGAGTCATTG Rv GGTGATGATCCAGCTACTTTGC
SEPN1	5	Fw CCAGAATCCAGTGGCTCT Rv AAGGCTCAGAGATGGGCAAG	
TTN	6	Fw AGGTGATTTGGCAGTATTAACAAA Rv ACTTAGCAGGTACCAAGTCAGT	
NEB	7	Fw CTGGAGTAAGGAAGCTGGTCAG Rv TAAAGGTTTGTGCTGGTCTCCC	Fw CTATCCTGGTTGTGTCTTGCTG Rv CAGATGCAAATGTAAGTGGCAT
MTM1	8	Fw TGTTGGTGCCAGATTGTAAGT Rv GGTAGCCTATTTGTCTAAGCCTG	
RYR1	9	Fw CTTCCCTGCAGCTTTGGTG Rv TCCCCAACATTGCTAGTCCA	Fw TGTAGGAAAAGATATTGAGAGCCC Rv CCCTGAAATTCTGATAGGGGC
RYR1	11	Fw TTGGATGAGGGAAGTACAGACC Rv ATGAATGAACAAGTGGTGCC	
RYR1	12	Fw GCATGGTATTTTACAGGGAGCA Rv GTAGTCTCATGCTTGCCTGG	Fw TGAGGAGGAATTTGCAGTGAGA Rv GGCAACAGAGGTAGAGATGAAAG
MTMR14	13	Fw GCCTAGCATCACATCTTCCC Rv GGATTAACACCTGGGGAAAGTG	
TPM3	15	Fw CTCTTGACCATTGAGCACATT Rv GAGTTTGACCACTTTGCCTAG	
SEPN1	16	Fw GGGACCCTGGCCGCTTTGAT Rv CTCACCCACGCCCCTACCAT	
COL6A2	17	Fw GGCCTGGTCTTTTCTCAGTGG Rv GAGCCATGGAAGGAGTGGGT	
COL6A1	18	Fw CTCCCCACCCCAAATACCCC Rv CTGTCAGACTTGGTGCCCTC	
LMNA	19	Fw GACAGTGTCCCTCTGGGGTG Rv CCTTGTCCACTGCTCCACA	

LAMA2	20	Fw ACCCTCTACTCTTTGGTTTAACT Rv AACATCCTGCTACAGTGAACCT	Fw GTCCTTTCTGAAATACATTG Rv CATCTTTCCTACAAGTAACTG
COL6A1	21	Fw TGTTGGGTACCAGGGAATGAAGGT Rv TCTGACTCCTGCCTTCGTTT	
COL6A3	22	Fw ATTCAAATGGGGTGGAGTGGG Rv AGCGGGCTTGATGTATATGAGG	
CAPN3	23	Fw ACTAGGGCCCCACTAGAGAA Rv AGAGGTCATTGGCCCTTGTT	
FKRP	24	Fw GTGGACCTGGGCATCTACTT Rv GAAGCGGCGGTAGTTGTTAG	
SGCG	27	Fw AACTGCTGCATGGGATTAGG Rv GACAGTGGTTGTTAGTGGGTGA	
CAPN3	28	Fw GATGCATCTCACTCCAGCTCA Rv GGCTTGTGGATTTGTGTGCTA	Fw ACTAGGGCCCCACTAGAGAA Rv AGAGGTCATTGGCCCTTGTT
DOK7	30	Fw CTGCACTGTCACGGCCTC Rv CCTCTGCAGCCCACGTTG	Fw CAGCTGCAGGAGGTTGGC Rv TGGTGTGTCATAGTGGGCC
COG6	33	Fw AGTATACCCTTCTTGTGTTCTGGA Rv TCTAGATGCAGCAAGAGAAATT	Fw AGGAACAAAACACAGTCCATGC Rv GCAATACTAGCTCAGGTCAACA

* En cas de que el gen sigui d'herència recessiva.

Un cop fet el disseny de primers, es va sol·licitar la síntesi a l'empresa *Stabvida* que els entrega liofilitzats. A continuació, es van dissoldre a la concentració desitjada (200pmol/µl.) amb aigua destil·lada.

3.13.7.2 Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

És la reacció per la qual s'amplifica el fragment integrat entre els dos *primers* dissenyats amb l'ajuda d'una polimerasa termoestable (*BioTaq*, *Ecogen*) i amb una mescla de reactius que, a part dels *primers*, també inclouen tampó de reacció, solució de MgCl₂ 50mM (proveïdes amb la Taq), dNTPs que s'aniran afegint per formar els amplicons que després se seqüenciarà, i l'ADN/ADNc de la mostra que es vol comprovar. Tots ells en les proporcions mostrades a la taula 15.

Taula 16: Reactius presents a una reacció de PCR estàndard i les seves proporcions.

Reactiu	µl/mostra
10x NH ₄ Tampó	2,5
dNTPs (10mM)	0,5
Polimerasa BioTaq	0,1
50mM MgCl ₂	0,75
ADN (50ng/ul)	2
Primer Forward (10 pmol/µl)	1
Primer Reverse (10 pmol/µl)	1
Aigua MiliQ estèril	17,15

La PCR és una tècnica molt estandarditzada (figura 28), amb uns passos, temperatures i temps establerts. Tot i això, hi ha alguns factors que es poden modificar per fer la reacció més específica, com afegir 5% de DMSO a la reacció o modificar la quantitat de MgCl₂. A més, hi ha una de les etapes de la reacció que és variable, la temperatura a la qual els *primers* s'uneixen a la seqüència d'ADN (temperatura d'*annealing*), pel que el primer que es va fer va ser testar diferents temperatures a fi de determinar quina d'elles aconseguia una millor amplificació. Aquesta temperatura depèn de la naturalesa de la regió i de cada seqüència de primers (pel seu contingut en GCs...).

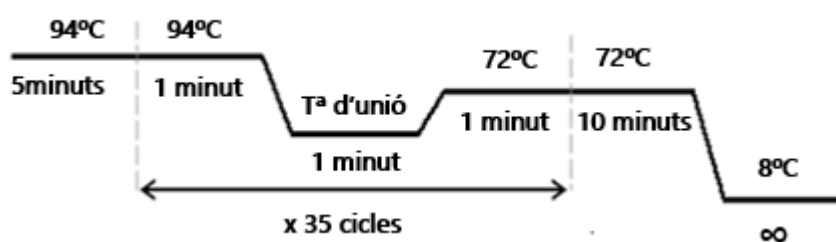


Figura 28: Etapes d'una PCR convencional.

És un protocol per termociclador estàndard, el que és variable és la temperatura d'unió i el temps d'allargament, que es pot modificar en funció de la mida de l'amplicó desitjat.

El resultat de la PCR es va comprovar mitjançant una electroforesis en gel al 1.5% d'agarosa preparat amb un agent intercalant del DNA, *RedSafe™* (*iNtRON Biotechnology*) durant 30 minuts a 120V, carregant també un marcador de pesos molecular per comprovar la mida de l'amplicó i verificar que es tractava de l'amplicó d'interès. Un cop corregut el DNA, el gel s'examina en un aparell transiluminador (*BioRad*).

3.13.7.3 Purificació de l'amplicó a seqüenciar

La purificació va consistir en l'addició d'un enzim al tub de la reacció de PCR que s'encarregava d'eliminar les seqüències de cadena única (*primers*) i altres restes que podrien interferir en la reacció de seqüenciació.

Aquest enzim és el reactiu *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent* (*ThermoFisher Scientific*), del qual s'afegeixen 2µl per cada 5µl de la reacció. Com en el pas de reacció de seqüència només s'utilitzen 2µl per cada *primer* i amb 5µl de producte de PCR és suficient. Un cop preparat, es va col·locar al termociclador on va estar a 37°C 15 minuts i a 80°C, 15 minuts més per inactivar l'enzim.

3.13.7.4 Reacció de seqüència i seqüenciació Sanger

Ja purificat el producte de PCR, es va continuar amb la reacció de seqüència. Es va realitzar utilitzant el *kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (*ThermoFisher Scientific*) que ja contenia la polimerasa, els dNTPs i els ddNTPs necessari per la reacció, seguint el programa pel termociclador facilitat per la casa comercial (figura 29).

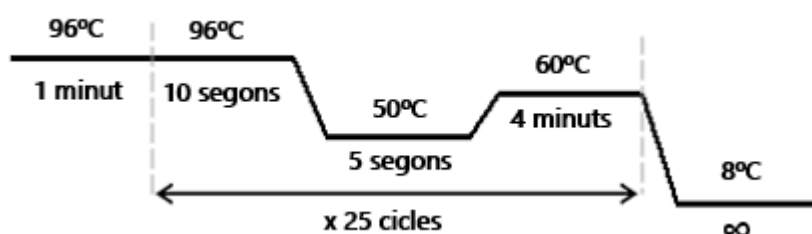


Figura 29: Programació de la reacció de seqüència.

El producte de la seqüència es va purificar amb el *kit BigDye X-Terminator™ Purification* (ThermoFisher Scientific) i es va carregar en una placa de 96 pous, que es va llegir en un seqüenciador capil·lar *ABI PRISM 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems) al departament de Genètica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Per a analitzar els resultats a partir de la visualització dels electroferogrames, es va utilitzar el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*¹⁵¹ o també el programa *SeqMan NGen® Version 12.0. (DNASTAR)*.

3.13.7.5 Validació de variants de significat incert (VUS)

En alguns casos es va requerir l'estudi de l'impacte funcional de variants trobades en els gens candidats però que el seu efecte en la proteïna no era clar. En aquest àmbit s'hi engloben les variants que afecten els llocs donadors/acceptors d'*splicing*, mutacions sinònimes i totes aquelles que afecten zones reguladores. Per aquests casos, es va extreure ARNm de la biòpsia muscular, tal i com s'explica en l'apartat 3.7.1 i 3.7.2. Tot seguit, es va realitzar una retrotranscripció de la mostra, amplificació per PCR del fragment d'interès, seqüenciació Sanger i visualització de les seqüències obtingudes.

Els primers utilitzats per aquest estudi són els exposats a la taula 17.

Taula 17: *Primers* usats per l'estudi funcional de VUS.

Gen	Pacient	<i>Primers</i>
NEB	7	Fw TGCTCACTGAAGTCCTGCATGTT
		Rv GAAAACGTTGGAAAAGGGATTC
COL6A2	17	Fw GGCTAGAAGGGAAGACAGGG
		Rv CCTGGGGCTCCACTGTTGC
COL6A3	22	Fw CTTGACAACATTGCCGAGAAAG
		Rv GCCAAAGCCACCATTCTTCC
CAPN3	28	Fw ATCCTCCGGGTCTTCTCTGAA
		Rv CTGGTTGTTGAGGTGGAATCC

RESULTATS

4.1 RESULTATS DEL TRACTAMENT AMB E2

Es va dissenyar un tractament amb E2 en ratolins *mdx*, per tal de confirmar els efectes beneficiosos de les hormones sexuals en un model de patologia distròfica, a més d'ajudar a descobrir possibles dianes terapèutiques. La troballa de noves dianes permetria abordar els tractaments, evitant els efectes adversos dels estrògens en nens.

Seguiment i evolució del tractament amb E2

Al principi d'aquest estudi es realitzaren els tractaments en dues camades de 4 i 8 animals cadascuna (la meitat adjudicada de forma aleatòria a cada condició) i dels quals es va produir un seguiment acurat tant a nivell de pes corporal com de les condicions postoperatòries inherents a la inserció del pellet (estat dels punts de sutura, bona cicatrització, dolor...).

L'evolució en el pes dels animals es va avaluar mitjançant el control setmanal, el que va permetre veure que l'addició d'E2 no va tenir un efecte en el pes de l'animal en un mes de tractament, com s'observa a la figura 30.

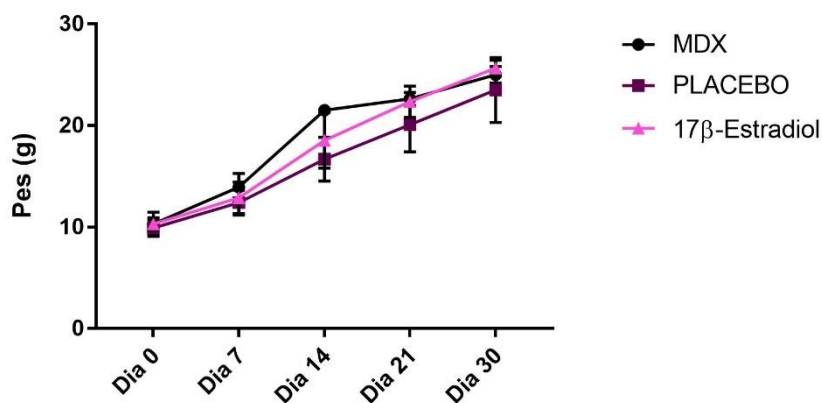


Figura 30: Evolució del pes dels animals al llarg del tractament.

A més, tots els animals a part de créixer d'igual forma, van cicatritzar correctament i no van presentar senyals de dolor en cap moment.

Valoració de l'efectivitat del tractament

El primer que calia avaluar és si la inserció dels pellets realitzava la funció per la que estaven dissenyats i augmentava els nivells d'E2 en plasma, pel que dels 12 animals tractats (6 amb E2 i 6 amb placebo) es va recollir sang i plasma, després de centrifugar-ho; mostres que posteriorment es van enviar al Servei de Bioquímica Clínica Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona per avaluar els nivells d'Estradiol en plasma.

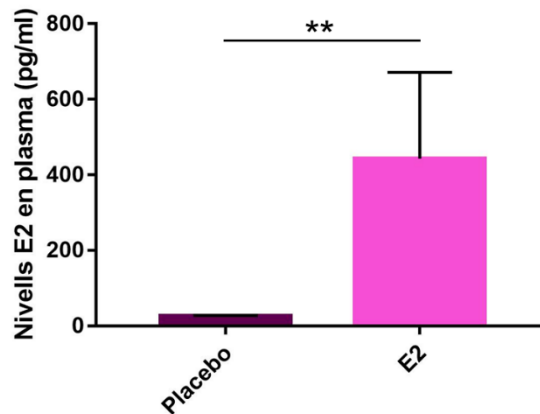


Figura 31: Nivells d'Estradiol en plasma.

Com es pot observar a la Figura 31, s'aconsegueix augmentar els nivells d'E2 en plasma pel que s'evidencia que els pellets són capaços d'alliberar el compost i que aquest es distribueix sistèmicament. Els valors de la mediana obtinguts per les dues condicions són: 26,8 (23,98 - 28,93) pels placebo i de 151,7 (55,33 - 1003) pels tractats amb E2, amb un p-valor de 0,0043 (**).

Quantificació dels nivells de Creatina Quinasa

El següent pas era determinar si el tractament aconseguia algun efecte beneficiós en el ratolí *mdx*, i és per això que les mateixes mostres van ser utilitzades per quantificar els nivells de CKs en plasma, un dels indicadors de dany muscular més comuns. En aquest cas els valors obtinguts van ser els recollits a la taula 18 i representats a la figura 32.

Taula 18: Valors dels nivells de CKs en sang (U/l)

Placebo	E2
1967,3	907,2
2811,8	1021,1
7154,9	5061,5
17404,3	3413,4
11701	5712,6
15628,1	3246,4

Els valors de la mitja que s'obtenen d'aquests són 9445 ± 2657 U/l pels placebo i $3227 \pm 812,9$ U/l; i (*) p-valor=0,049.

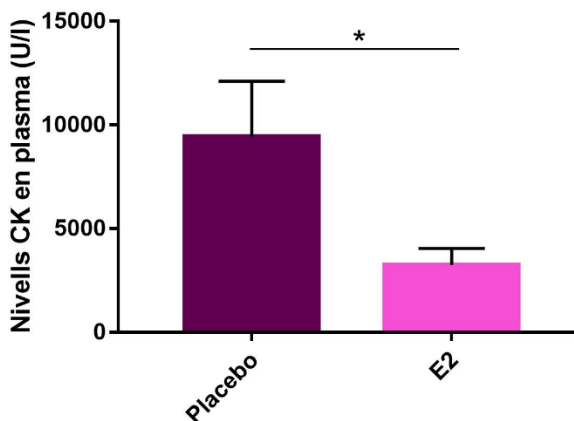


Figura 32: Nivells d'Estradiol en plasma.

Tenint en compte que un animal *wt* (de la soca C57BL10) té uns valors de CKs de 645 ± 323 U/l i un *mdx* (per valorar l'efecte de l'inserció del pellet) té uns valors de 18532 ± 14577 U/l¹⁵², amb aquest estudi es demostrava l'efectivitat del tractament amb E2. S'estava produint la reducció dràstica i significativa dels nivells de CKs en sang indicant que es produïa una reducció del dany muscular, tot i que aquests valor no arriben als que presenta un animal *wt*.

Anàlisi histològica

Com s'ha comentat en la introducció d'aquest treball, el ratolí *mdx* presenta un fenotip molt lleu que es fa més evident amb l'edat dels animals i depenent del múscul afecte. Tot i això, en el múscul quàdriceps, teixit escollit per l'estudi histològic es poden apreciar alguns dels trets comuns de la patologia per dèficit de distrofina, com són els grups de fibres en estat de necrosi-regeneració (GDR) o els nuclis centrals.

Es van comparar seccions de *mdx* tractats amb E2 i *mdx* placebo tenyides amb Hematoxilina-Eosina (HE). Es van avaluar diferents característiques morfològiques segons l'evolució dels GDR:

- Fibres musculars normals o no danyades: presenten el nucli perifèric, un sarcolemma intacte i un sarcoplasma no fragmentat.

- Fibres necròtiques: es detecten per la presència d'infiltració de cèl·lules inflamatòries i/o fibres degenerants amb sarcoplasma fragmentat.
- Fibres regenerants: fibres de mida petita que presenten nucli central.

També és possible avaluar la presència de fibrosi i el número de nuclis centrals per mitjà d'aquesta tinció.

En l'estudi de les seccions de quàdriceps no es van apreciar diferències en cap d'aquestes característiques. Tot i això, a la figura 33, es poden apreciar els trets típics del múscul deficient en distrofina.

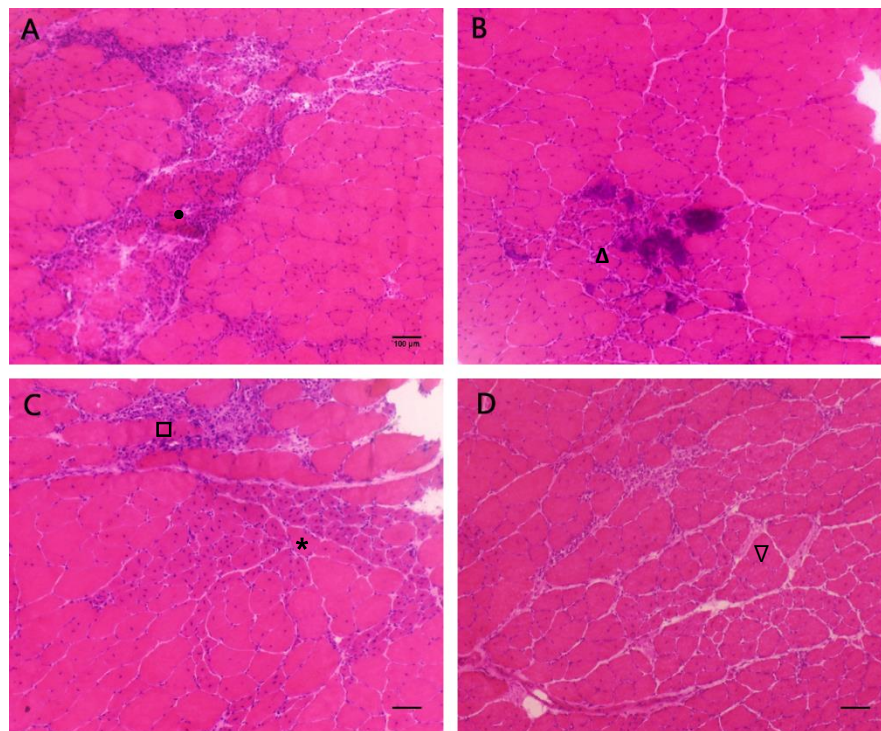


Figura 33: Estudi histològic del gastrocnemi dels ratolins del tractament amb E2.

Representació de diferents temps de l'evolució de la necrosi-regeneració en les característiques histològiques estudiades. En el cas dels grups de degeneració-regeneració: (A) S'observa un grup gran de GDR que està en fase de regeneració amb fibres que s'han mantingut sense necrosar entremig(*) (B) S'observa un grup GDR amb infiltració de cèl·lules inflamatòries (Δ). (C) Es pot apreciar un grup en necrosi (□) i un altre en fase de regeneració (*). i (D) Presència de infiltració de teixit connectiu (∇). L'escala correspon a 100μm.

Anàlisi de l'expressió gènica per microarrays

Amb els resultats en els marcadors de dany muscular semblava que el tractament amb E2 estava millorant el fenotip però saber l'expressió de quins gens s'està veient alterada és crucial per entendre el mecanisme d'acció dels estrògens al múscul.

Per això es van seleccionar 8 animals dels 12 tractats (4 de cada condició) i prèvia extracció d'ARN total, es van enviar a l'empresa Bioarray S.L. per realitzar uns microarrays d'expressió gènica.

Es van realitzar dos anàlisi:

- En el primer anàlisi, es van obtenir 561 gens diferencialment expressats (237, infraexpressats i 324 sobreexpressats), un número relativament baix pel que es va mirar el número de gens amb un logFC (estimació dels "cops de canvi", és a dir, expressió de la mostra respecte la referència) elevat i es va comprovar que normalment això és degut a que hi ha un cert grau de variabilitat biològica entre les mostres de la mateixa condició i el model paramètric utilitzat és molt exigent en quant a la variància de les mesures d'expressió.
- En el segon anàlisi, es va fer un llistat de 986 gens (438, infraexpressats i 548, sobreexpressats).

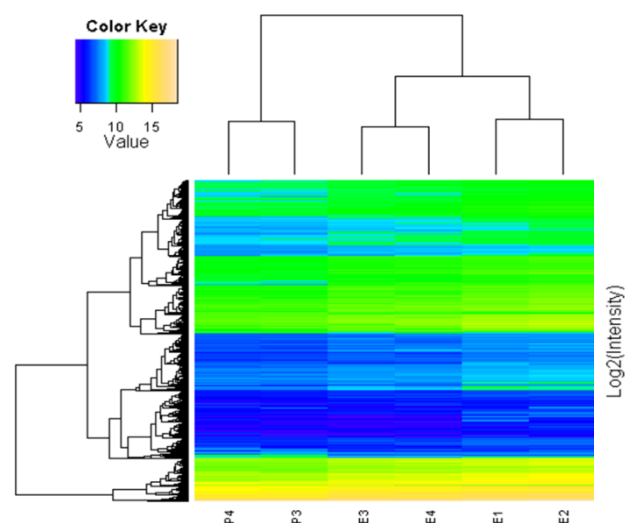
Es van aplicar aquests dos tipus d'anàlisi per comprovar si realment s'observaven diferències degudes al tractament i assegurar-se que no era tot efecte de la variabilitat biològica intrínseca de cada animal. L'anàlisi comparatiu de tots dos tests va revelar que els resultats de tots dos tot i que difereixen en número de gens significatius, són similars.

Alguns de les representacions gràfiques de l'anàlisi per microarrays realitzat es presenten a les figures 34.

Figura 34: Heatmap d'algunes de les mostres dels microarrays.

Recull de les dades d'expressió dels diferents gens entre les diferents mostres indicades per colors.

Imatge aportada per l'empresa Bioarray, S.L.



Anàlisi de vies

Amb els dos llistats de gens, sobreexpressats i infraexpressats, dels dos anàlisi es va realitzar un anàlisi de vies de senyalització amb el paquet GOSTats. Per no perdre resultats interessants la llista de vies de senyalització enriquides pels processos biològics (GO BP) va ser escollida per determinar quins mecanismes podien estar alterant els estrògens.

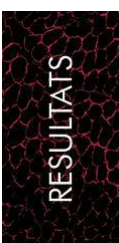
Taula 19: Vies diferencialment enriquides

A la taula 19 es recullen alguns dels processos biològics amb més gens diferencialment expressats.

GOBPID	Terme	Gens diferencialment expressats observats	p-valor
GO:0007275	Desenvolupament d'organismes multicel·lulars	138	8,21E-15
GO:0032502	Processos de desenvolupament	143	8,55E-13
GO:0002376	Processos del sistema immunitari	68	1,12E-12
GO:0048513	Desenvolupament d'òrgans	87	1,38E-09
GO:0048285	Fissió d'òrgànuls	26	1,39E-09
GO:0009987	Processos cel·lulars	349	3,67E-10
GO:0050900	Migració de leucòcits	18	3,44E-09
GO:0051301	Divisió cel·lular	30	5,68E-09
GO:0008283	Proliferació cel·lular	55	4,35E-07
GO:0006873	Homeòstasi iònica cel·lular	30	9,34E-07
GO:0016265	Mort	57	3,93E-06
GO:0030154	Diferenciació cel·lular	79	2,86E-05
GO:0006954	Resposta inflamatòria	21	3,04E-05
GO:0009611	Resposta a danys	28	4,36E-05
GO:0001816	Producció de citoquines	20	0,000106

Segons al resultat de l'enriquiment de vies, l'E2 va tenir un efecte sobre el desenvolupament, la proliferació i el sistema immunitari, també en la resposta inflamatòria.

El següent pas va ser seleccionar un seguit de gens que ens permetessin per un costat validar els resultats en tots els animals i per l'altre, buscar possibles dianes a partir de les quals treballar. Per això es va fer una correlació entre aquestes vies d'interès i els 100 gens més diferencialment expressats (50 sobreexpressats i 50 infraexpressats), la representació de la qual es troba a la taula A de l'annex. Es van tenir en compte sobretot aquells gens que estaven implicats en les vies de proliferació i diferenciació cel·lular, en la regulació de la mort cel·lular i en la resposta inflamatòria. I tot seguit es va fer una cerca sobre les funcions d'aquest llistat i se'n van seleccionar 3, que van ser validats per PCR quantitativa.



El primer gen seleccionat va ser el receptor de neurotrofines de baixa afinitat, Ngfr o p75^{NTR}, membre de la família dels receptors TNF (de l'anglès, Tumor Necrosis Factor). La seva validació es pot veure a la figura 35.

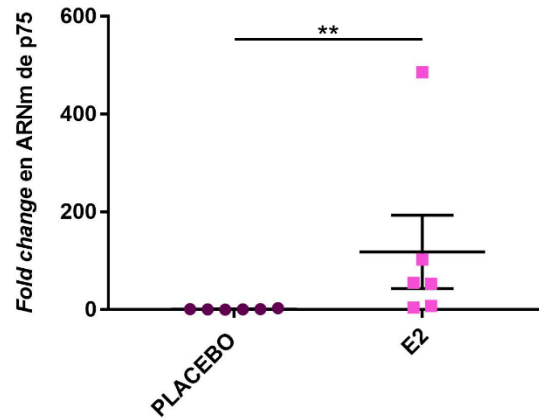


Figura 35: Representació dels valors d'expressió de l'ARNm de p75^{NTR} dels animals tractats amb E2 i placebo.

Els valors obtinguts per qPCR tenen una mediana de 0,94 (0,6 – 1,74) pels placebo i de 54,27 (6,908 – 198,5), dels E2. (**) p-valor=0,0022.



El següent gen seleccionat va ser MMP-9 (*Matrix Metalloprotease 9*). Es tracta d'una proteïna de la família de les metal·loproteases, que s'encarreguen de regular la formació, remodelació i degradació de la matriu extracel·lular (ECM)¹⁵³ (figura 36).

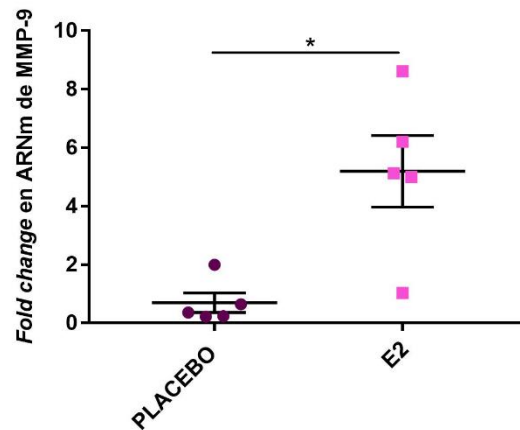


Figura 36: Representació dels valors d'expressió de l'ARNm de MMP-9 dels animals tractats amb E2 i placebo.

Els valors obtinguts per qPCR tenen una mediana de 0,3655 (0,23 – 1,32) pels placebo i de 5,128 (3,013 – 7,409), (*) p-valor= 0.0159.

Un altre gen seleccionat va ser WISP2 o CCN5, perquè forma part de una família de gens implicats directament en la fibrosi¹⁵⁴. Es va comprovar la sobreexpressió per qPCR (figura 37).

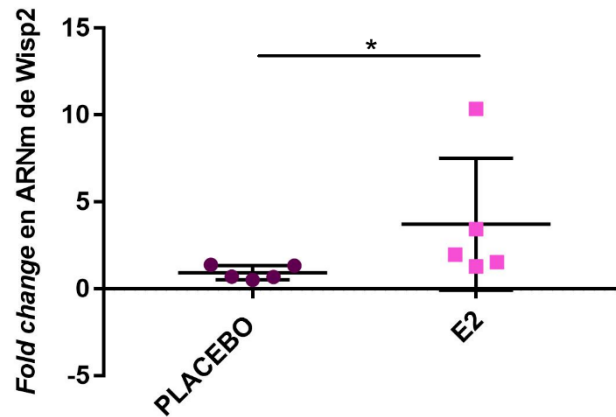


Figura 37: Representació dels valors d'expressió de l'ARNm de Wisp2 dels animals tractats amb E2 i placebo.

Els valors obtinguts per qPCR tenen una mediana de 0,71 (0,6 – 1,36) pels placebo i de 1,98 (1,41 – 6,89), (*) p-valor= 0.0317.

A més, es van mirar els nivells d'expressió de *dmd* i els altres gens de la família, *utr* i *drp2*. Els microarrays no van recollir diferències d'expressió per la distrofina o la utrofina però sí per la Drp2 (de l'anglès, *Dystrophin related protein 2*). Es tracta d'un gen de la família de la distrofina que s'expressa sobretot a diferents parts del cervell¹⁵⁵. Els resultats van ser validats per qPCR (figura 38).

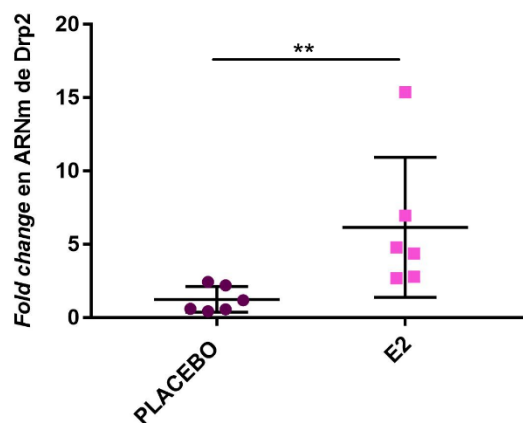


Figura 38: Representació dels valors d'expressió de l'ARNm de Drp2 dels animals tractats amb E2 i placebo.

Els valors obtinguts per qPCR tenen una mediana de 0,90 (0,54 – 2,26) pels placebo i de 4,59 (2,77 – 9,06), (**) p-valor=0,0022.

Aplicació de tests funcionals per avaluar el rendiment físic dels animals i per augmentar l'efecte de l'E2

L'aplicació de dos tests funcionals dissenyats i recomanats per la xarxa d'excel·lència Treat-NMD permet ahora valorar l'estat físic dels nostres animals i veure així si existeix alguna diferència entre grups de tractament. Va tenir un interès particular veure si el tractament amb E2 aconseguia modificar el rendiment físic del ratolí *mdx* i de pas, comprovar si, com està descrit, l'aplicació d'algun tipus d'exercici produïa un major efecte dels estrògens en el múscul esquelètic.

Per dur a terme això, es van tractar ratolins *mdx* amb els pellets novament durant un mes avaluant-los funcionalment un cop per setmana. En total es van tractar 8 animals amb pellet placebo i 9 animals amb pellet d'E2, que a partir d'aquest punt se'ls anomenarà com animals que han realitzat exercici.

El primer test realitzat va ser el de suspensió per dues extremitats (en anglès, *Two-limb hanging test*) en la que avaluem la coordinació en el cos de l'animal. Els resultats revelen diferències significatives a partir de les dues setmanes de tractament (dia 16), coincidint amb el pic de necrosi-regeneració que es produeix a les 5 setmanes d'edat, i fins al final del tractament. Els animals tractats amb E2 aguanten més temps suspesos en dues extremitats i presenten millor coordinació que els placebo (figura 39).

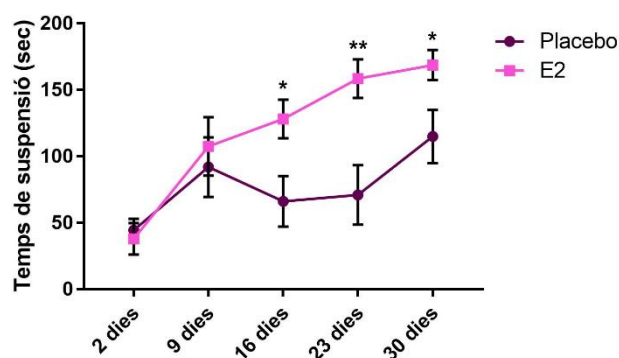


Figura 39: Gràfic representatiu del Test de suspensió per dues extremitats al llarg del tractament.

16 dies, (*) p-valor= 0,018; 23 dies, (**) p-valor =0,0041; 30 dies, (*) p-valor= 0,035.

L'altre test realitzat va ser el de suspensió per quatre extremitats (en anglès, *Four-limb hanging test*) en la que es valora la força de l'animal per aguantar-se. En aquest cas, s'observa una tendència semblant a la present en el test anterior però les diferències

només resulten significatives en el punt de necrosi-regeneració, en el que els tractats amb E2 assoleixen un temps més alt de suspensió (figura 40).

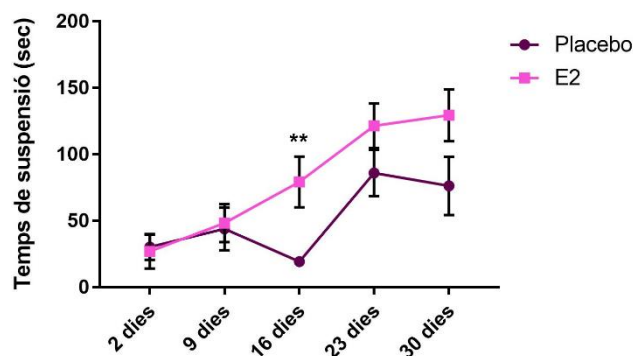
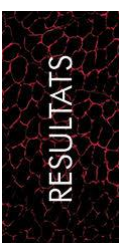


Figura 40: Gràfic representatiu del Test de suspensió per quatre extremitats al llarg del tractament.

16 dies, (**) p-valor=0,007.



Evolució i seguiment del pes

En aquesta tanda de tractaments, igual que en l'anterior també es va fer un control nivell de pes corporal però també de les condicions postoperatòries. En aquest cas, els resultats van ser com els de l'experiment anterior i no s'observaven diferències significatives però sí una tendència a l'augment en el pes dels animals amb pellet i que han realitzat exercici, tal i com es pot veure a la figura 41.

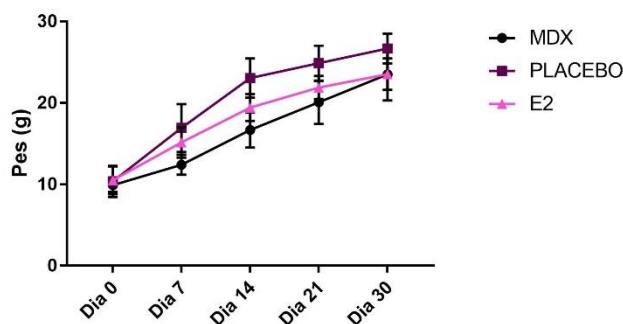


Figura 41: Evolució del pes dels animals durant la segona tanda de tractaments.

Diferències respecte l'experiment anterior

Per comprovar que els canvis observats en la primera tanda de tractaments ocorrien o fins i tot, es potenciaven amb l'exercici, es va decidir valorar les mateixes característiques que en el cas anterior.

El primer de tot va ser enviar el plasma dels animals tractats per quantificar els nivells d'Estradiol i Creatina Quinasa. Pel que fa als nivells d'E2, amb l'exercici sumat al tractament es van incrementar molt els valors dels animals amb pellet de E2 comparat amb els placebo (figura 42).

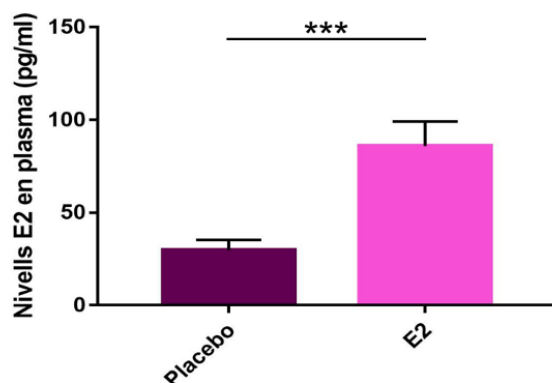


Figura 42: Nivells d'Estradiol en plasma.

Els valors de la mediana obtinguts per les dues condicions són: 20 (20 – 39,25) pels Placebo i de 86,7 (56,7 – 124,5) pels tractats amb E2 i amb un p-valor de 0,0009 (***).

També es van quantificar els nivells de CKs (figura 43) per tal de veure si aquest segon tractament era efectiu a pesar de l'exercici, amb el que es potencia el dany tissular i el fenotip distròfic i per tant, els nivells basals de CKs en aquest tractament ja serien més alts. Als valors que observem (taula 18), es fa evident que els nivells augmenten a nivell basal però el tractament resulta molt efectiu en la reducció i atenuació de l'alliberament de l'enzim en sang. Els valors de la mitjana de cada condició són de 46.810 ± 12.424 U/l pels placebo i de 8.568 ± 5.139 U/l pels tractats amb E2 i $p=0,0055$ (**).

Taula 19: Valors dels nivells de CKs en sang (U/l)

Placebo	E2
75891	1772,3
1987,5	15109
72037	15370,8
3329,1	5955,4
47208	6574
90519	4455,2
16256,3	6919,4
67252	14857,1
	6102,6

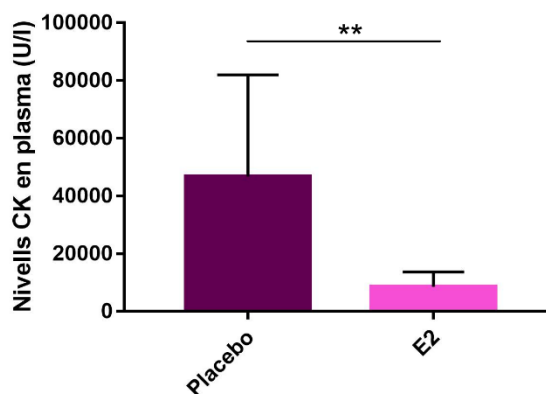


Figura 43: Nivells d'Estradiol en plasma.

Anàlisi histològic de la segona part d'experiments amb E2

En aquests experiments també es va realitzar un anàlisi del quàdriceps dels animals comparatiu entre les dues condicions, en el que es va comprovar que tampoc s'observaven diferències en les característiques histològiques anteriorment esmentades (estat dels grups GDR, quantitat de nuclis centrals, presència d'infiltració de cèl·lules immunitàries). Però tot i això, sí que s'observa una tendència en el moment de la regeneració d'alguns GDR dels animals tractats amb E2, trobant-se en etapes de maduració de les fibres regenerants, que s'identifiquen per l'acúmulo de moltes fibres de mida petita amb nucli central, mentre que en els animals placebo els GDR es troben en estadis més primerencs, de necrosi. Aquests trets es poden veure a la figura 44.

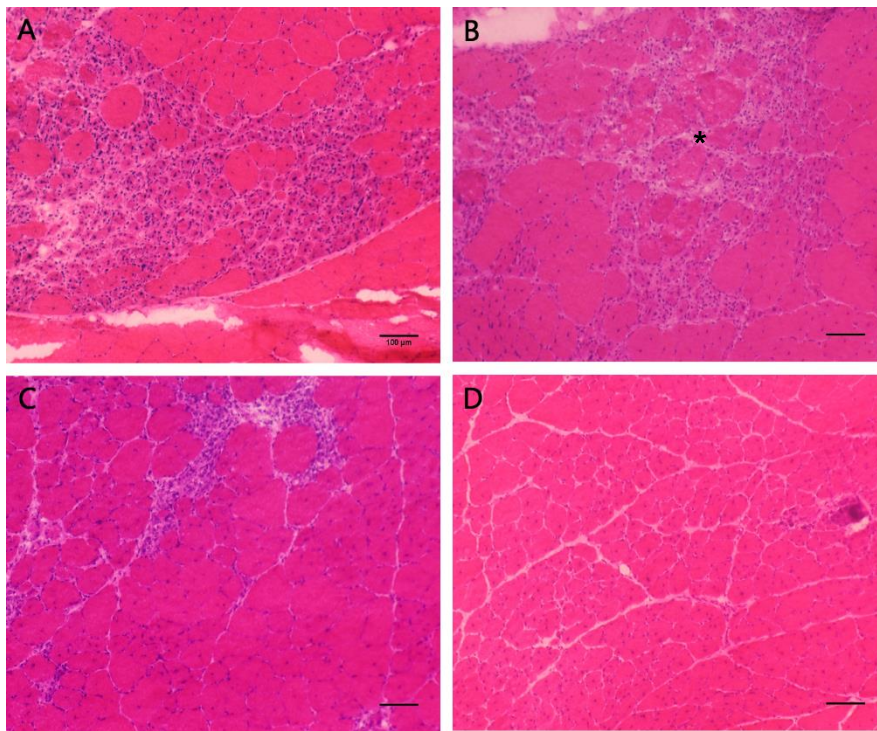


Figura 44: Estudi histològic del quàdriceps dels ratolins del tractament amb 17β-Estradiol de la segona tanda.

Representació de diferents trets de la patologia. Es pot comprovar diferències en l'etapa de regeneració dels GDR, (A) GDR en primeres de etapes, en inici de regeneració, amb fibres de mida petita i (B) GDR en necrosi amb zona de fibres en inici de degeneració (*) (les fibres es tornen més clares i amb tinció desigual. (C) GDR en fase de necrosi i (D) Fibres es estadi de maduració. L'escala de les imatges correspon a 100μm.

El següent pas en aquest estudi era comprovar si l'aplicació d'exercici produïa algun efecte en el fenotip distròfic, pel que es va comprovar si les manifestacions histològiques es tornaven més evidents. Com es pot comprovar a la figura 45, en aquestes imatges a 4X s'apreciava un augment de la necrosi i posterior regeneració a tot el teixit, denotant l'augment dels trets distròfics en l'animal.

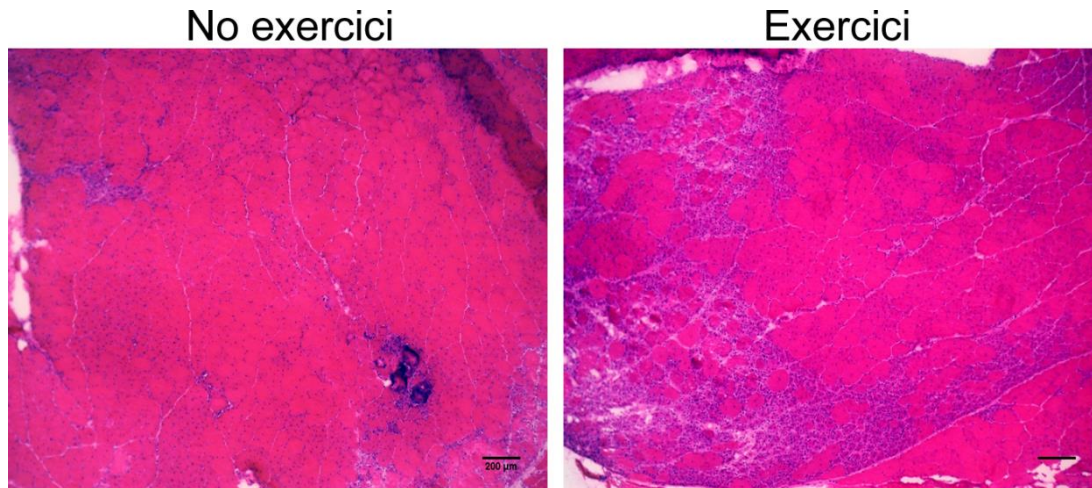


Figura 45: Comparació entre els dos estudis histològics.

L'escala correspon a 200μ,

Estudi dels gens diferencials del microarrays usats per la validació als nous tractaments

Un punt important per saber si amb l'aplicació dels tests funcionals se segueixen mantenint o es potencien els efectes de l'E2, va ser analitzar els nivells d'expressió dels tres gens utilitzats per validar els resultats de la qPCR en un dels apartats anteriors. Com es pot observar als gràfics de la figura 46, les diferències en els valors de canvi de p75^{NTR} i de Wisp2, segueixen sent significatius però no els de Drp2, que tot i que mantenen la tendència d'augment en els tractats amb E2, el seu p-valor es queda en 0,068. En canvi, per MMP-9, s'aprecia un augment als tractats amb E2 però tendeixen a normalitzar-se amb els placebo.

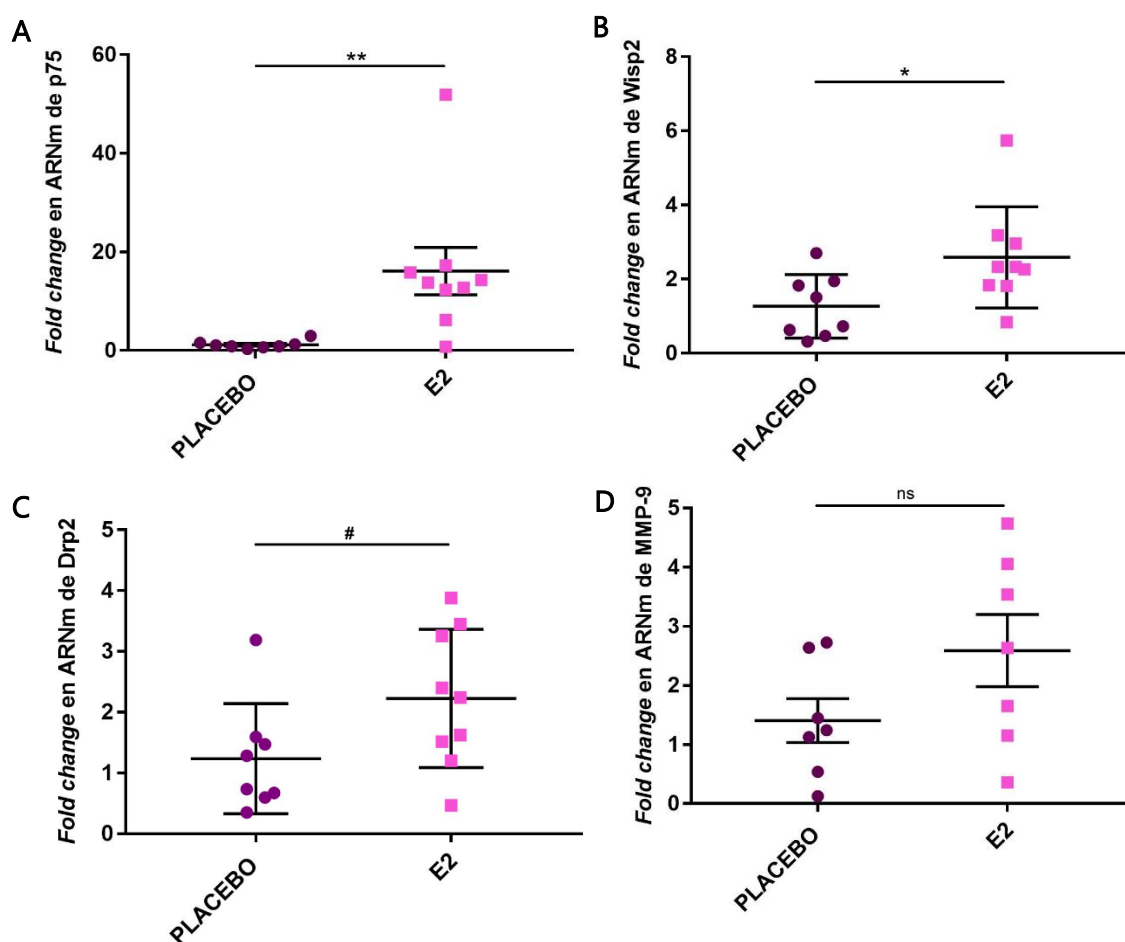


Figura 46: Representació dels valors d'expressió de l'ARNm de p75^{NTR} (A), Wisp2 (B), Drp2 (C) i MMP-9 (D) dels animals tractats amb E2 i placebo que han realitzat tests funcionals.

(A) Els valors obtinguts per qPCR de p75^{NTR} tenen una mediana de 0,975 (0,715 – 1,478) pels placebo i de 13,77 (9,27 – 16,56) pels d'E2, (**) p-valor=0,0025. (B) Per l'ARNm de Wisp2 els valors de la mitjana són de 1,268±0,303 pels placebo, i de 2,59±0,4554, pels d'E2, (*) p-valor=0,0327. (C) Per Drp2 els valors de la mitjana són de 1,237±0,3208 pels placebo, i de 2,228±0,3789, (#) p-valor=0,068. (D) I per MMP-9 els valors són de 1,407±0,3703 pels placebo, i de 2,591±0,6095, pels d'E2.

Altres estudis modificadors de la patologia

Amb els estudis per tinció amb Hematoxilina-Eosina ja s'havia vist que l'E2 no aconseguia modificar els patrons de dany muscular però es va voler comprovar si el tractament podia estar atenuant alguna de les alteracions histològiques que es produïen per l'absència de distrofina: l'increment d'ions calci intracel·lular o l'aparició i augment de fibrosi.

Per tal d'estudiar si l'E2 influeix en l'homeòstasi del calci en el model animal *mdx*, es van realitzar diferents estudis moleculars i histològics amb mostres dels animals tractats amb l'hormona sexual.

El primer de tot va ser fer la recerca d'una tinció histològica que ens permetés veure l'acúmul de Calci intracel·lular i es va fer la tinció d'Alizarin Red S, en talls de quàdriceps tant en els animals que van realitzar exercici com els previs, que no.

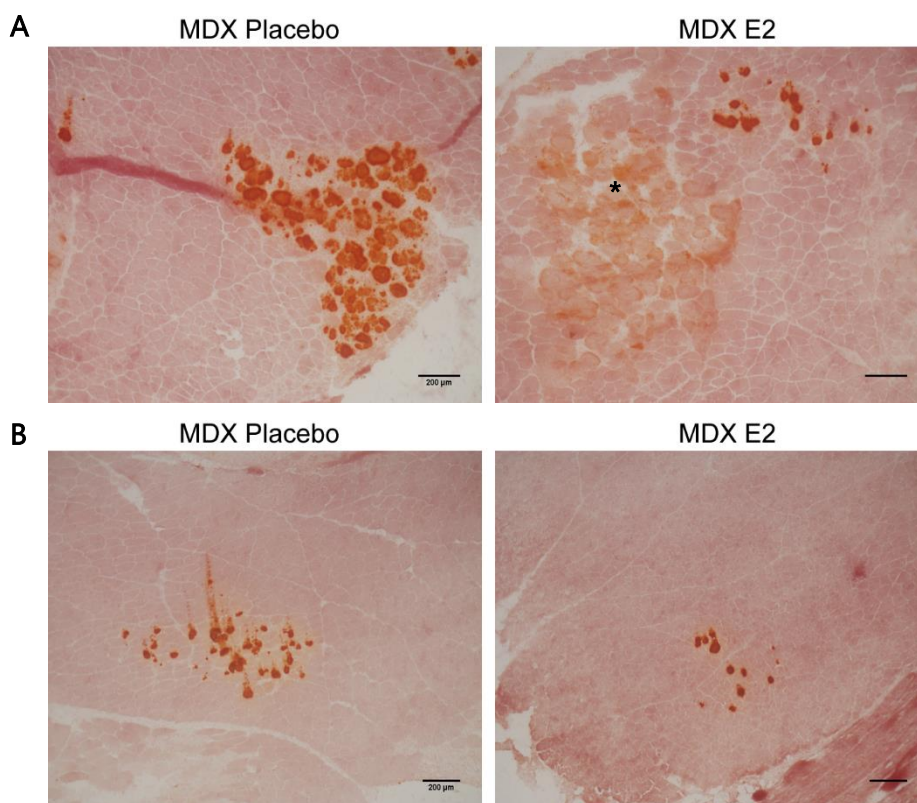


Figura 47: Tinció Alizarin Red S en múscul quàdriceps.

(A) Imatges corresponents a animals de la primera ronda de tractament, sense exercici. (B) Imatges corresponents a animals del tractament que van realitzar exercici. Els acúmuls es presenten com els punts roig-ataronjats més forts. A més, en les zones on les fibres estan necrosant (*) es presenta una coloració més taronja. L'escala representa 200µm.

Com es pot veure a la figura 47, s'observa un increment dels acúmuls de calci en els animals placebo respecte els tractats amb E2, sent molt més evidents en els animals que no van realitzar exercici. De fet el comptatge de punts tenyits (es van comptar 10 seccions de tots els animals del tractament) posa de manifest l'anteriorment dit, ja que les dues condicions placebo presenten unes mitjanes de fibres amb acúmul de 113 (no exercici) i 62 (exercici) mentre que els E2 tenen 37 (no exercici) i 11 (exercici) fibres amb elevat Ca^{2+} intracel·lular.

A continuació, es van fer els anàlisis moleculars seleccionant els gens per estar relacionats amb el maneig de calci al Reticle Sarcoplasmàtic: RyR1, SERCA1a i SERCA2a, la funció dels quals s'explica a la introducció.

Com s'explica a la secció 1.1.3 de la introducció, el quàdriceps es considera un múscul glicolític i el diafragma és un múscul oxidatiu, de manera que tenen diferents metabolismes. Això pot tenir un impacte en l'homeòstasi del calci. Per aquest motiu, es van seleccionar aquests dos tipus de músculs per analitzar l'expressió de RyR1, SERCA1a i SERCA2a, i veure si els canvis observats podien ser susceptibles al tipus de metabolisme. Primer de tot, es va realitzar una PCR a temps real per analitzar les diferències d'expressió en l'ARNm d'aquests gens en 4 ratolins de cada condició per tal de veure preliminarment si s'observen diferències.

Encara que cap de les diferències entre els grups establerts és estadísticament significativa, es poden observar certes tendències. L'expressió gènica va augmentar en tots els grups de placebo en animals no exercitats, mentre que en animals exercitats, es va observar una major expressió en grups tractats amb estradiol. Aquests resultats es pot veure a la figura 48.

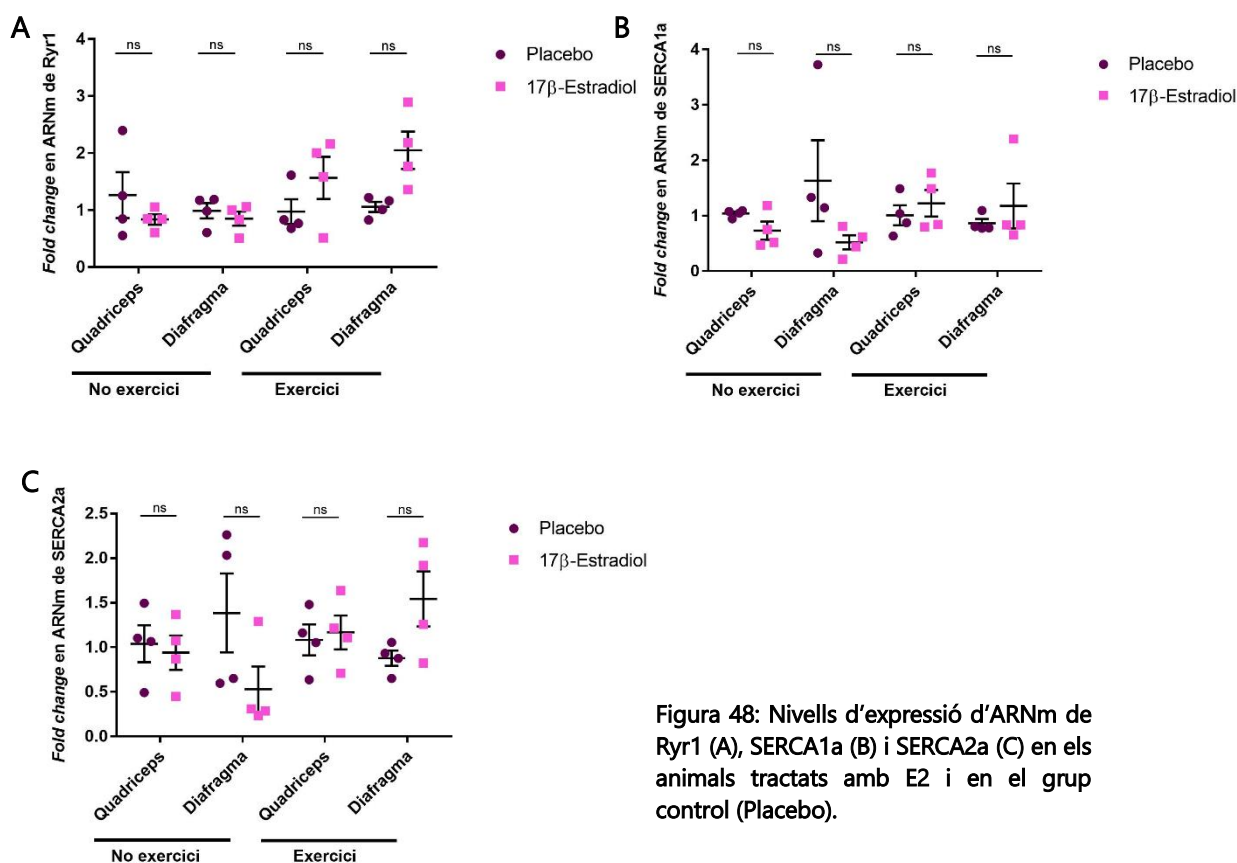


Figura 48: Nivells d'expressió d'ARNm de RyR1 (A), SERCA1a (B) i SERCA2a (C) en els animals tractats amb E2 i en el grup control (Placebo).

Pel que fa a l'expressió de proteïnes, RyR1 va ser estudiat per Western Blot en els mateixos animals i músculs analitzats que per PCR en temps real. En aquest cas, es van observar diferències entre els dos tipus de músculs: en el diafragma, l'expressió de RyR1 va ser major en animals que havien fet exercici. Aquesta diferència va resultar estadísticament significativa, tal com es representa a la figura 49. En canvi, les diferències en l'expressió de RyR1 en quàdriceps no van resultar tan evidents.

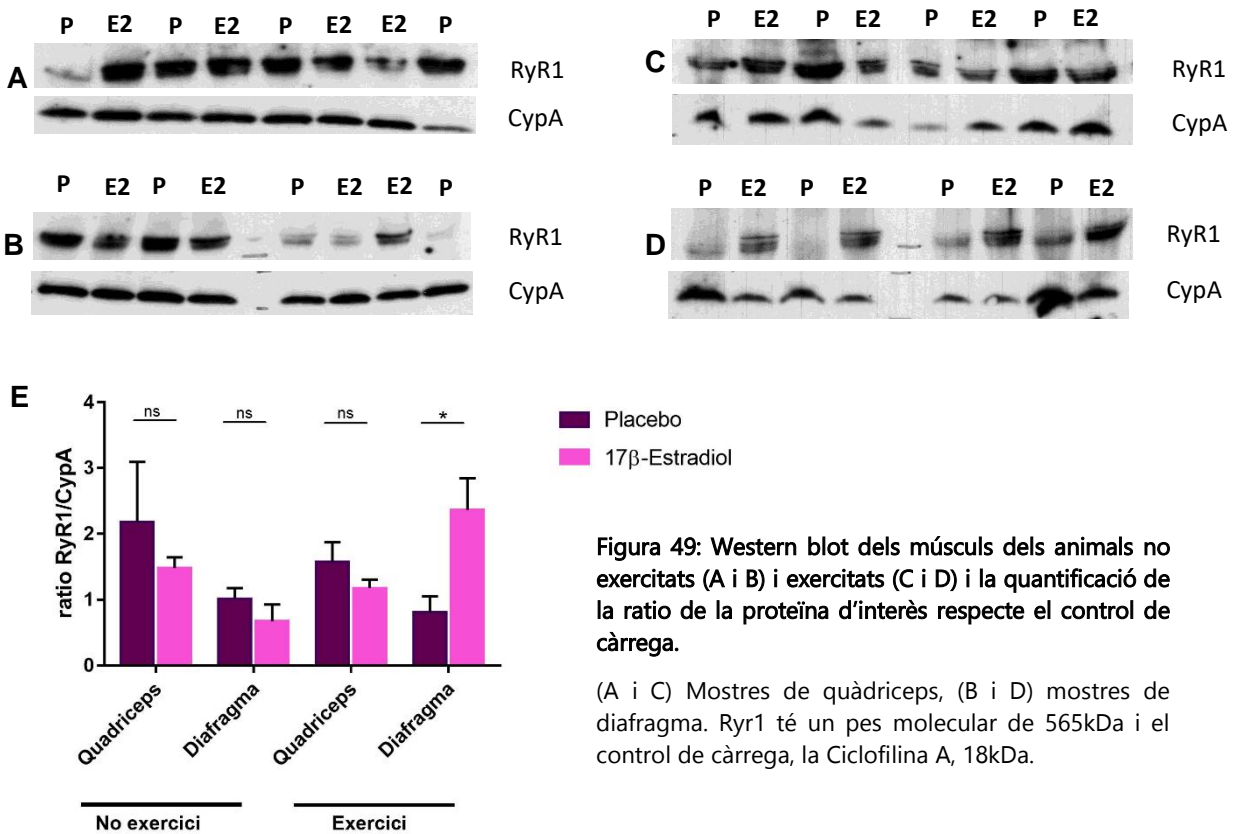


Figura 49: Western blot dels músculs dels animals no exercitats (A i B) i exercitats (C i D) i la quantificació de la ratio de la proteïna d'interès respecte el control de càrrega.

(A i C) Mostres de quàdriceps, (B i D) mostres de diafragma. RyR1 té un pes molecular de 565kDa i el control de càrrega, la Ciclofilina A, 18kDa.

Una de les característiques histològiques dels Dmd és la substitució progressiva en el temps, del múscul per teixit adipós i connectiu, pel que veure si el tractament d'E2 produeix la disminució o alentiment dels dipòsits de col·lagen marcaria un possible mecanisme d'acció d'aquesta hormona sexual atenuant el fenotip distròfic.

Per tal de visualitzar-ho, es va realitzar una tinció de Tricròmic de Masson en talls de quàdriceps dels animals usats per l'estudi. En aquesta tinció les fibres musculars es tenyeixen de roig fosc, el teixit connectiu i col·lagen es tenyeixen de blau i els nuclis de lila.

En l'anàlisi de les diferents imatges, no es van apreciar diferències entre els animals placebo i els d'E2, de fet, no es van apreciar gairebé dipòsits de teixit connectiu com es pot veure a la figura 50. Això és degut a l'edat de l'animal (les acumulacions de teixit connectiu s'aprecien a partir de l'any de vida) i del múscul escollit (la fibrosi és més evident a diafragma).

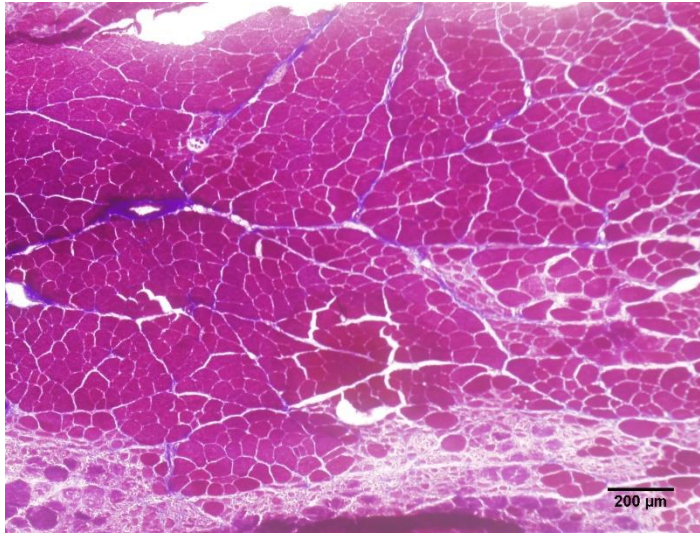


Figura 50: Tinció de Tricròmic de Masson en tall de quàdriceps de ratolí mdx que ha realitzat exercici.

L'escala representa 200µm.

Receptors d'estrògens

El estrògens realitzen gran part de la seva funció per mitjà de la unió als seus receptors. Existeixen dos receptors, ben descrits i implicats en molts mecanismes no només en els òrgans sexuals si no a nivell de tot l'organisme, que són el receptor d'estrògens alfa (ER α) i el receptor d'estrògens beta (ER β). Per tal d'entendre el mecanisme d'acció de l'E2 en el ratolí *mdx* va ser rellevant saber com es trobaven els nivells d'ARNm per aquests dos receptors. Per això es va realitzar una PCR a temps real.

Els resultats que es van obtenir es representen a la figura 51 i ens marquen:

- Per l'ER α , una tendència a disminuir en els tractats amb E2 que no van realitzar exercici, però un augment en els que si en van realitzar respecte els placebo corresponents.
- Per l'ER β , no s'observen diferències en els animals de la primera tanda de tractaments, sense exercici, però si s'aprecia que els nivells d'ARNm tendeixen a disminuir en els tractats amb hormona sexual que van fer exercici comparat amb els placebo.

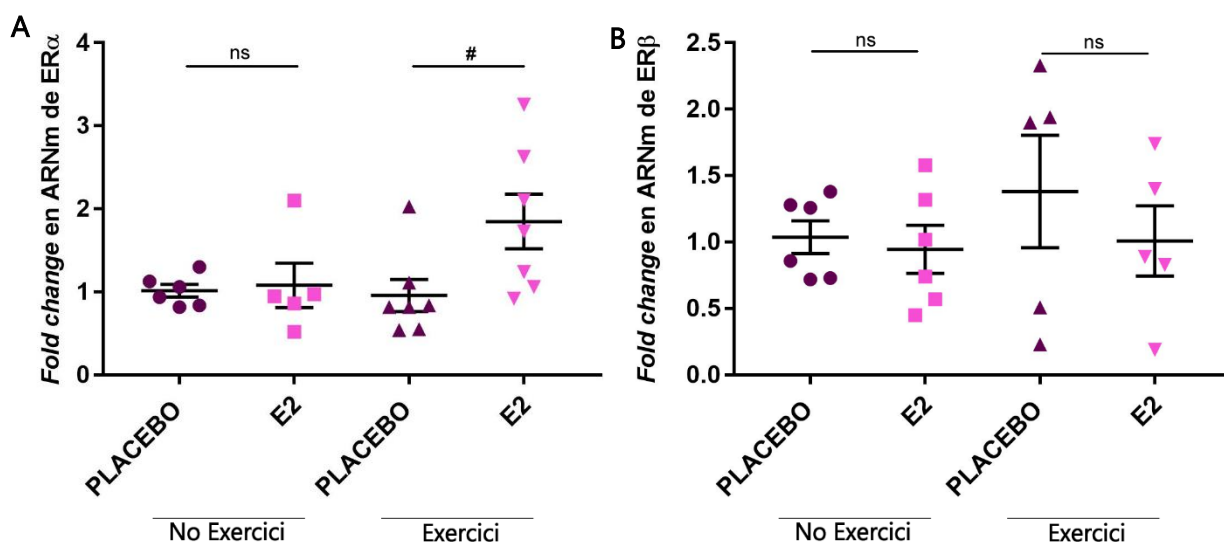


Figura 51: Valors de canvi d'expressió dels receptors d'estrògens (ER α i ER β).

(A) Expressió d'ER α en les diferents condicions. Els valors de la mitjana observats són de 1,015±0,075 pels placebo i 1,08±0,268 pels tractats amb E2, sense exercici. I pels que van realitzar exercici, 0,959±0,193 pels placebo i de 1,71±0,314, pels E2, (#) p-valor=0,0503. (B) Expressió d'ER β en les diferents condicions. Els valors de la mitjana observats són de 1,03±0,123 pels placebo i 0,947±0,1805 pels tractats amb E2, sense exercici. I pels que van realitzar exercici, 1,38±0,422 pels placebo i de 1,01±0,265, pels E2.

Per quina via de senyalització poden estar actuant els estrògens?

Elucidar quina via de senyalització pot estar activant l'E2 amb el nostre tractament és essencial per entendre l'efecte global de les hormones sexuals en el múscul esquelètic deficient en distrofina.

Pel que el primer que es va realitzar va ser revisar les vies de senyalització enriquides en els resultats dels microarrays per identificar quines d'elles eren bones candidates. Com a via de senyalització, la de l'Akt/Protein Kinase B es trobava representada tres vegades a la llista de vies enriquides positivament (veure taula següent,20).

Taula 20: Registre dels cops que surt la via d'Akt/KB als resultats dels microarrays

GOBPID	p-valor	OddsRatio	ExpCount	Count	Size	Term
GO:0051897	0.007	8.397	0	3	52	Positive regulation of protein kinase B signaling cascade
GO:0051896	0.014	6.230	1	3	69	Regulation of protein kinase B signaling cascade
GO:0043491	0.030	4.668	1	3	91	Protein kinase B signaling cascade

* Resultats extrets del llistat de vies enriquides positivament.

Donat el paper d'aquesta via de senyalització en múltiples processos cel·lulars essencials per tots els teixits, inclòs el múscul esquelètic, es va fer un estudi de les seves principals accions. L'interès principal va recaure en la seva implicació positiva en la proliferació i supervivència cel·lular, però sobretot en aquesta última ja que es va hipotetitzar que els estrògens estaven realitzant la funció de frenar la mort cel·lular en el nostre model.

Per això es van estudiar els nivells d'ARNm de dos gens, la funció dels quals està implicada en la determinació de l'apoptosi cel·lular i regulada directa o indirectament per Akt. El primer d'ells és Bcl2 (de l'anglès *B-cell lymphoma 2*), un factor supressor d'apoptosi que es troba a la membrana dels mitocondris, i el segon, Bax (també conegut en anglès com *bcl-2-like protein 4*), un factor pro-apoptòtic. La seva ratio (Bax/Bcl2) determina si una cèl·lula (en aquest cas, el teixit diana) serà més (ratio ≥ 1) o menys (ratio < 1) susceptible als estímuls apoptòtics. Es va realitzar una PCR a temps real per aquests dos gens en 4 animals de cada condició de tractament i exercici.

Els resultats obtinguts demostren una tendència a l'augment de Bcl2 i una disminució de Bax en els animals tractats amb E2, que es pot veure a la figura 52.

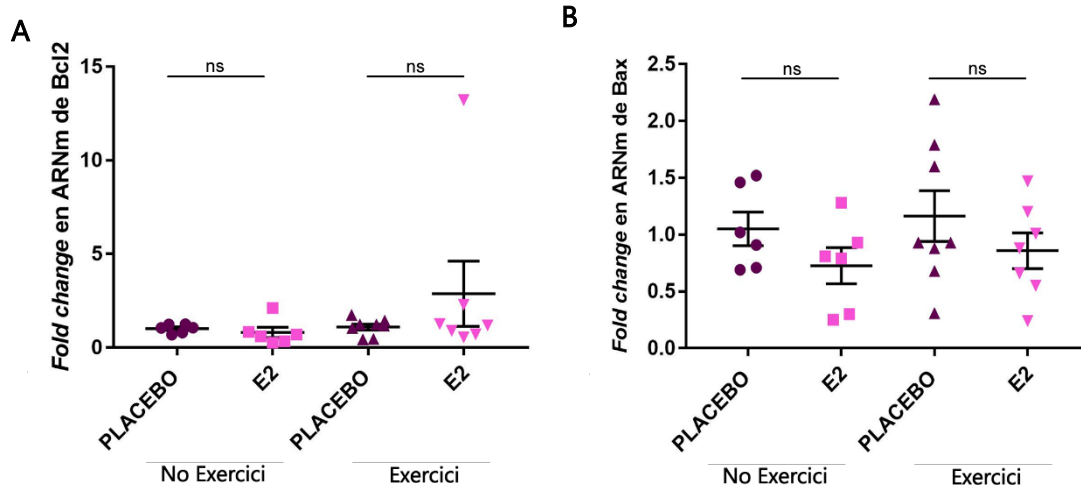


Figura 52: Valors d'expressió dels gens relacionats amb l'apoptosi, Bcl2 i Bax.

(A) Expressió de Bcl2 en les diferents condicions. Els valors de la mitjana ± desviació observats són de $1,023 \pm 0,092$ pels placebo i $0,817 \pm 0,27$ pels tractats amb E2, sense exercici. I pels que van realitzar exercici, $1,103 \pm 0,158$ pels placebo i de $2,525 \pm 1,545$, pels E2. (B) Expressió de Bax en les diferents condicions. Els valors de la mitjana ± desviació observats són de $1,052 \pm 0,148$ pels placebo i $0,728 \pm 0,16$ pels tractats amb E2, sense exercici. I pels que van realitzar exercici, $1,16 \pm 0,223$ pels placebo i de $0,859 \pm 0,157$, pels E2.

Pel que fa al ratio Bax/Bcl2 i com es veu a la figura 53, també s'observa una tendència a que els animals tractats amb E2 tinguin una ratio més baixa, observant-se aquesta tendència més clara en els animals que van realitzar exercici.

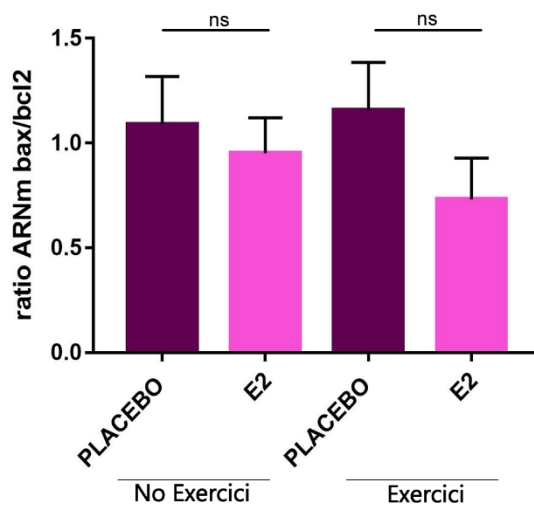


Figura 53: Ratio Bax/Bcl2 per totes les condicions.

Els valors de ratio més baixos es tradueixen en una capacitat a resistir els estímuls apoptòtics més elevada.

Estudi d'altres gens relacionats amb la miogènesi

Es va voler veure com estava l'expressió d'altres gens implicats directament amb la miogènesi com són dos membres amb funcions gairebé contraposades com la Miogenina, que promou la correcta diferenciació de les cèl·lules precursors, i de la Miostatina, que inhibeix la miogènesi (el creixement i la diferenciació).

Per dur a terme aquest estudi, es va realitzar el mateix que en els últims apartats, una PCR a temps real per aquests dos gens en 4 animals de cada condició.

Els resultats mostren que la miogenina tendeix a trobar-se augmentada en els animals tractats amb E2 que no s'han exercitat. En canvi, per la miostatina no s'observa una tendència clara i tots els animals presenten valors comparables d'expressió (figura 54).

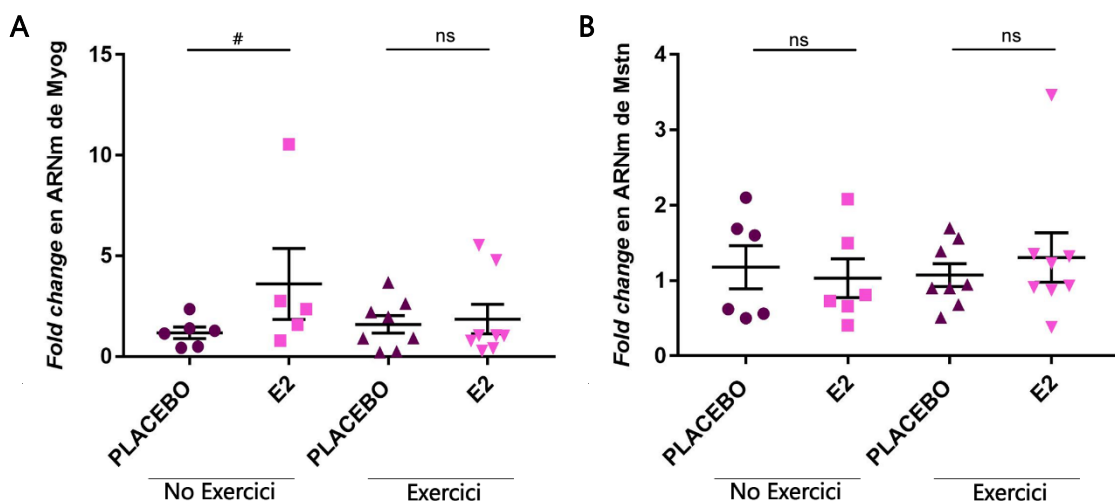


Figura 54: Nivells d'expressió de proteïnes relacionades amb la miogènesi (Miogenina i Miostatina)

(A) La miogenina tendeix a augmentar en els animals tractats amb E2 amb uns valors de mediana de 1,21 (0,475 – 1,63) pels placebo i de 2,36 (1,185 – 6,65) pels E2 de la primera tanda de tractaments, amb un p-valor de 0,0823; i de 1,445 (0,422 – 2,525) pels placebo i de 1,035 (0,495 – 3,845) pels E2 de la segona. (B) La miostatina tendeix a disminuir en els animals tractats amb E2 que no van realitzar exercici amb uns valors de mitjana de 1,178±0,285 pels placebo i 1,032±0,257 pels E2. En canvi, per la segona tanda de tractament els valors de la mediana van ser de 0,925 (0,735 – 1,518) pels placebo i de 1,08 (0,88 – 1,343) pels E2.

Una proteïna que té un elevat interès comprovar el seu estat és la utrofina, sobreexpressada en el ratolí deficient en distrofina, ja que sembla que aquesta proteïna podria ser la causa del fenotip més lleu dels ratolins *mdx*. A més, en la nostra immunofluorescència de doble marcatge amb p75^{NTR} semblava haver-hi més immunotinció en els animals tractats respecte els placebo (veure figura 60), tot i no sortir

una diferència significativa als resultats dels microarrays. Per veure com estaven els nivells d'ARNm de la Utrn, es va dur a terme una PCR a temps real en les mateixes condicions que les anteriors i es va veure un augment evident, tot i que no significatiu, en els animals E2 de la primera tanda de tractament comparat amb els seus placebo i com aquestes diferències no hi són post-exercici (figura 55).

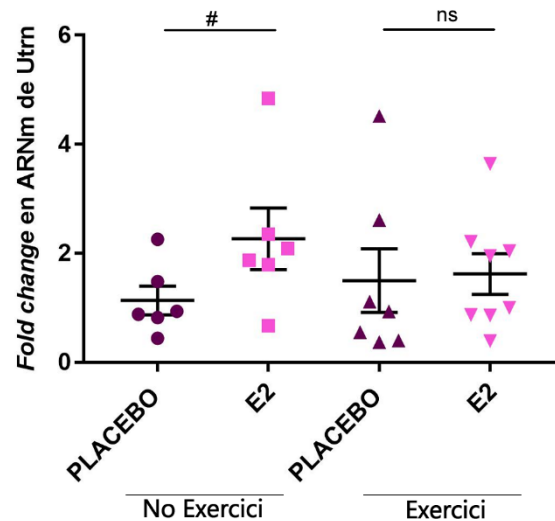


Figura 55: Nivells d'expressió de la utrofina.

(A) La utrofina es troba sobreexpressada en els tractats amb E2 de la primera tanda amb uns valors de mitjana de $1,137 \pm 0,262$ pels placebo i de $2,268 \pm 0,566$ pels E2, (#) p-valor=0,099. En canvi no es veuen diferències en la segona tanda amb valors de mediana de 0,93 (0,40 – 2,61) pels placebo i de 1,475 (0,862 – 2,168) pels E2.

Quin és l'estat de les cèl·lules satèl·lit?

Per últim, tenia molt interès mirar si el nostre tractament aconseguia modificar l'estat del *pool* de cèl·lules satèl·lit en el múscul esquelètic estudiat, en aquest cas, el quàdriceps. Per això es van quantificar els nivells d'ARNm de dos gens que regulen el destí d'aquestes cèl·lules, Pax7 (expressat en cèl·lules satèl·lit quiescents i en cèl·lules satèl·lit activades, com també en cèl·lules progenitores) i MyoD (expressat en cèl·lules satèl·lit activades i els progenitors musculars: mioblasts, miòcits...) en 4 animals de cada condició.

Els resultats, representats a la figura 56, denoten un augment de Pax7 en els ratolins tractats amb E2 sent una diferència significativa en els animals que no van realitzar exercici. Aquests animals presenten també un augment de MyoD respecte els seus placebo, mentre que els valors es normalitzen en la segona tanda de tractament.

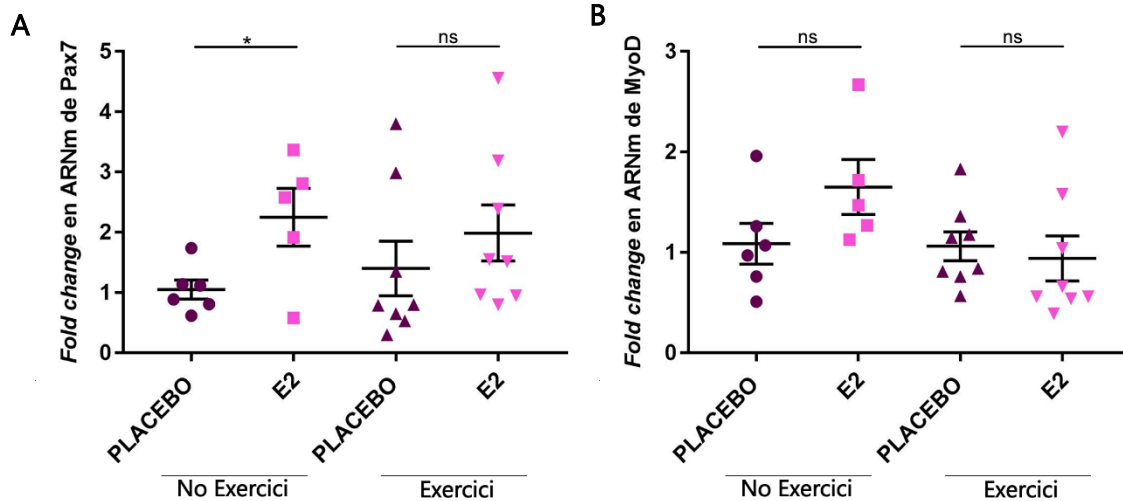


Figura 56: Valors de canvi d'expressió pels marcadors de cèl·lules satèl·lit Pax7 i MyoD

(A) Expressió de Pax7 en les diferents condicions. Els valors de la mitjana observats són de $1,053 \pm 0,159$ pels placebo i $2,25 \pm 0,478$ pels tractats amb E2, sense exercici, amb un p-valor de 0,03. I pels que van realitzar exercici, la seva mediana és 0,795 (0,56 – 2,58) pels placebo i de 1,535 (0,955 – 2,99), pels E2. (B) Expressió de MyoD en les diferents condicions. Els valors de la mitjana observats són de $1,09 \pm 0,2038$ pels placebo i $1,652 \pm 0,273$ pels tractats amb E2, sense exercici. I pels que van realitzar exercici, $1,063 \pm 0,143$ pels placebo i de $0,941 \pm 0,225$, pels E2.

Aquestes diferències a nivell d'ARNm es van voler comprovar també a nivell proteic mitjançant un Western Blot de 2 mostres de cada condició i els resultats van demostrar un augment visible de la quantitat de Pax7 mentre que MyoD es mantenia en una intensitat constant en totes les mostres (figura 57).

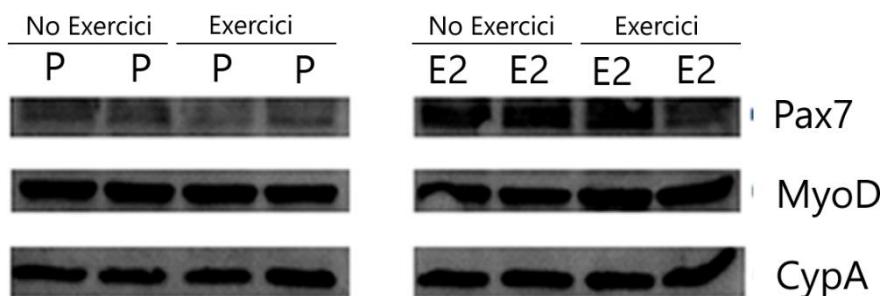


Figura 57: Western Blot per Pax7 i MyoD de les mostres dels animals tractats

Amb el marcatge de CypA, proteïna utilitzada com a control de càrrega que en permet normalitzar l'expressió de les proteïnes d'interès. Els pesos moleculars de les proteïnes són 54kDa per Pax7, 38kDa per MyoD i 18kDa per CypA.

.La ratio entre aquestes dues proteïnes ens dóna una informació extra, ja que sembla ser crític a l'hora de determinar el destí de la cèl·lula satèl·lit, permetent la diferenciació terminal (Pax7 baix/MyoD alt) o mantenint l'estat de progenitor indiferenciat (Pax7 alt/MyoD baix). Tot i que, MyoD es manté constant en totes les mostres, l'augment de Pax7 faria decantar la balança cap al segon estat.

Quina és la relació E2 – p75?

Per dilucidar quina relació presenten els estrògens amb l'expressió del receptor de neurotrofines, p75^{NTR} es va fer un estudi comparatiu dels nivells d'expressió d'aquest gen entre ratolins *mdx* mascles i femelles de tres edats diferents: 5 setmanes, 3 mesos i 6 mesos. La n de cada condició van ser de 3 animals.

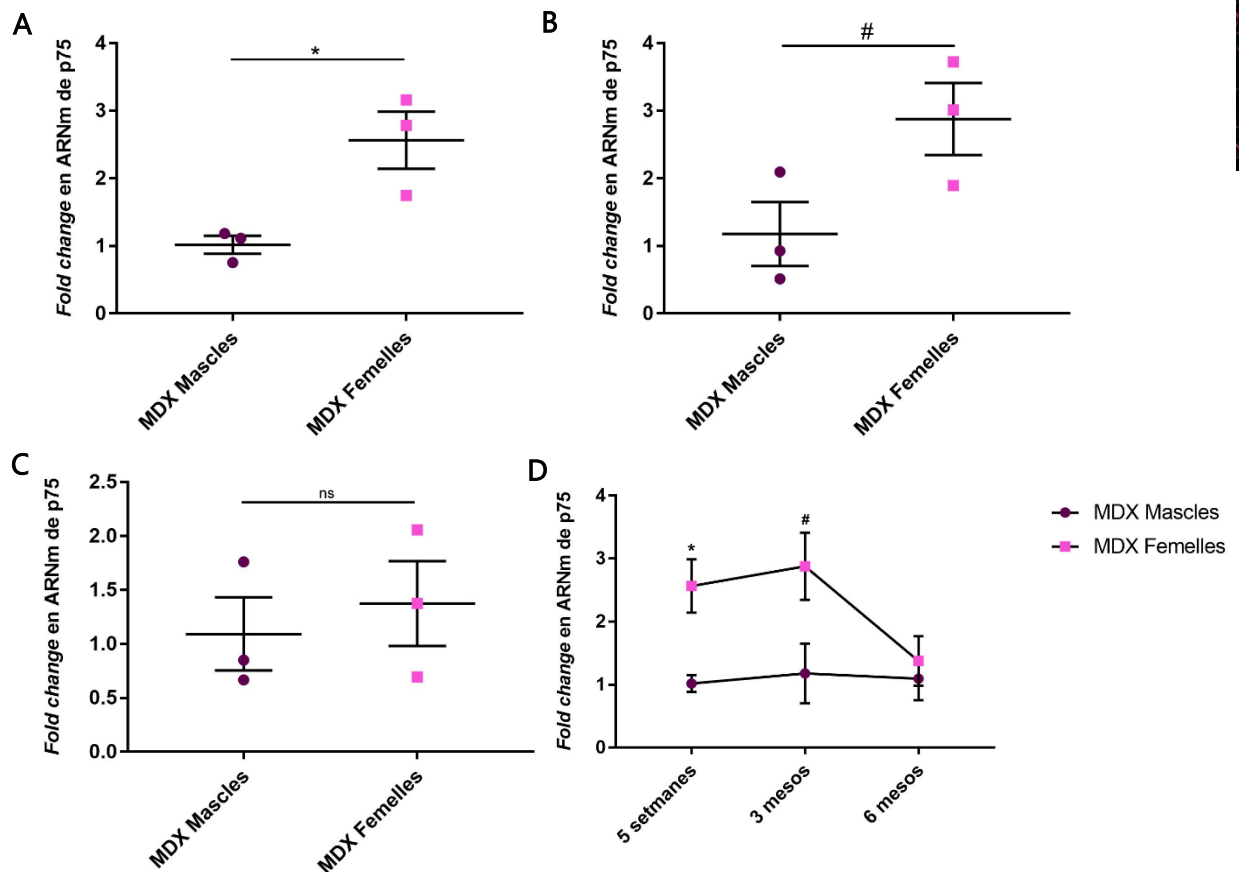


Figura 58: Comparació dels valors d'expressió de p75 entre *mdx* mascles i femelles.

(A) Expressió de p75 en mascles i femelles de 5 setmanes d'edat, amb uns valors de mitjana de $1,019 \pm 0,23$ pels mascles i $2,565 \pm 0,73$, per femelles, amb un (*) p-valor=0,0252. (B) Expressió de p75 en mascles i femelles de 3 mesos d'edat, amb uns valors de mitjana de $1,179 \pm 0,82$ pels mascles i $2,877 \pm 0,92$, per femelles, amb un (#) p-valor=0,0758. (C) Expressió de p75 en mascles i femelles de 6 mesos d'edat, amb uns valors de mitjana de $1,093 \pm 0,59$ pels mascles i $1,375 \pm 0,68$, per femelles. (D) Evolució dels nivells de p75 amb l'edat dels animals.

Com s'observa a la figura 58, a les 5 setmanes, els nivells d'expressió de p75^{NTR} eren més alts en les femelles que en els mascles, i aquesta diferència resultava estadísticament significativa. Als 3 mesos, la diferència no era estadísticament significativa, però els nivells es mantenien més alts en les femelles. A partir dels 6 mesos els nivells es normalitzen i els de les femelles disminueixen fins als valors dels de l'altre sexe.

Estudi proteic de p75

Després d'una recerca bibliogràfica, p75^{NTR} va ser seleccionat per realitzar més estudis degut al seu interès funcional en el múscul. El primer que es va realitzar va ser comprovar si l'augment de l'ARNm es traduïa en un augment de la proteïna.

Es va realitzar un Western Blot per p75^{NTR} en 4 animals de la primera tanda de tractament (2 placebo i 2 tractats amb E2) i 4 més de la segona tanda (també, 2 placebo i 2 tractats amb E2). Tal i com es veu a la figura 59, el revelat demostrava l'augment proteic en la mateixa mesura que la qPCR ho feia per l'ARNm. Curiosament, en la segona part de la imatge (animals que van realitzar exercici) es veu un augment d'intensitat tan en placebo com a E2. De fet, la diferència entre els dos placebos també resulta significativa (*, p-valor: 0,0125).

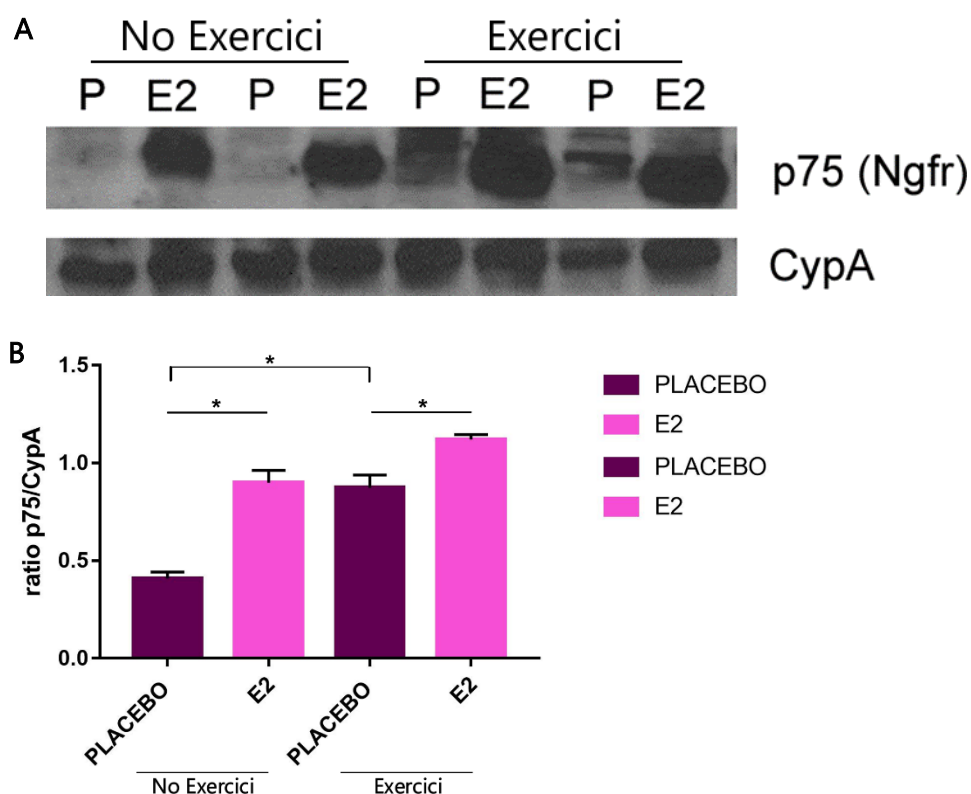


Figura 59: Western blot per p75^{NTR}.

(A) Imatge del revelat amb la banda immunoreactiva corresponent a p75^{NTR} (a 75kDa) i de la proteïna utilitzada com a control de càrrega, la Ciclofilina A (CypA) (a 18kDa). (B) Quantificació per intensitats de la ratio entre la proteïna d'interès i el control de càrrega amb el software ImageJ. Comparació Placebo-E2 sense exercici, (*) p-valor=0,0102; comparació Placebo-E2 amb exercici, (*) p-valor=0,0392; i comparació placebo-placebo, (*) p-valor=0,0125.

I el que resultava més interessant era comprovar on es localitzava aquesta proteïna en el múscul quàdriceps dels ratolins tractats, pel que es va realitzar una immunofluorescència de doble marcatge p75^{NTR} i utrofina. La utrofina, tal i com s'ha dit anteriorment, s'expressa com a substituta de la distrofina quan aquesta manca i s'expressa sobretot en les fibres regeneratives^{76,77}, pel que com es pot veure la co-localització entre les dues proteïnes demostra que p75^{NTR} també s'expressa en fibres regenerants i nuclis. A més, en les imatges es fa evident l'augment de marcatge en els tractats amb E2 respecte els placebo (figura 60).

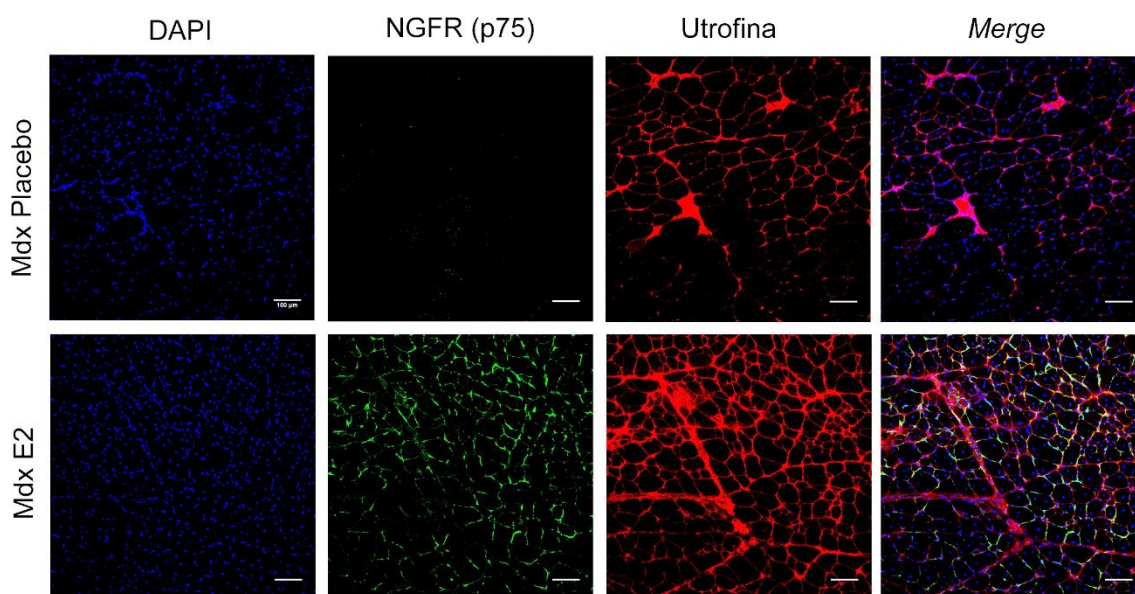


Figura 60: Immunofluorescència per p75^{NTR} i utrofina.

La proteïna p75^{NTR} en el múscul esquelètic (en aquest cas, quàdriceps) es localitza a la membrana d'algunes fibres (molt probablement, les regeneratives) i en alguns nuclis (tenyits amb DAPI). L'escala equival a 100µm.

Es van prendre imatges a 20X augments de 20 camps diferents per cadascun dels talls d'animals estudiats (5 de cada condició) i es va quantificar, amb l'ajuda del software ImageJ, el número de fibres positives i l'àrea d'aquestes. En total es van quantificar una mitja de 200 fibres per cadascun. Com es pot comprovar a la figura següent, els animal tractats amb E2 presenten un número més elevat de fibres p75^{NTR} positives i l'àrea

d'aquestes no difereix respecte les fibres negatives. Tot i això, sembla que hi ha una tendència a que les fibres dels animals tractats amb E2 tinguin una àrea més gran que els placebo (figura 61).

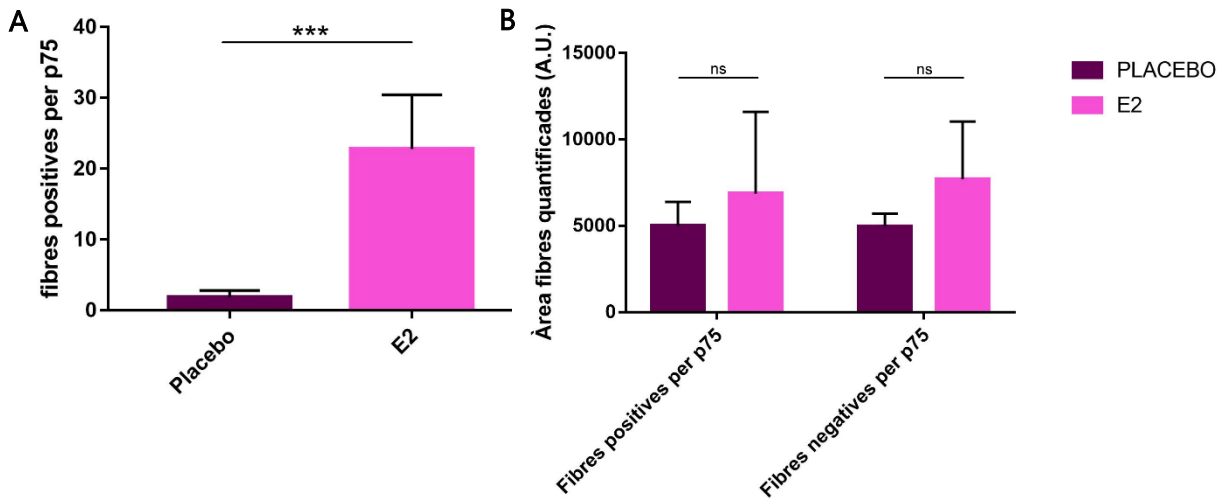


Figura 61: Quantificacions de la immunofluorescència per p75^{NTR}.

(A) Fibres positives per p75^{NTR}, amb valors de mediana 0 (0 – 4.75) pels placebo i de 13 (6.5 – 38) pels E2; i (B) àrea de les fibres quantificades.

Estudi de neurotrofines

Donada la implicació de la proteïna p75^{NTR} en el múscul esquelètic exposada en l'apartat de gens seleccionats per validar els resultats dels microarrays, té un especial interès dilucidar si aquest receptor actua mitjançant la unió d'algun dels seus lligands o no, i si el tractament aconsegueix incrementar la presència de les neurotrofines o de l'altre receptor, el d'alta afinitat TrkA (present al múscul adult i receptor preferent de NGF). Per això es van determinar els nivell d'ARNm al múscul quàdriceps dels ratolins per NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 i TrkA.

Els resultats que es van obtenir reflecteixen:

- Pel que fa a les neurotrofines no es van veure diferències significatives degudes al tractament per cap d'elles, però es veu un augment significatiu degut a l'exercici per NGF i BDNF (figura 62). Els nivells de proteïna de NGF van ser analitzats per WB i tampoc es van observar diferències (figura A de l'annex).

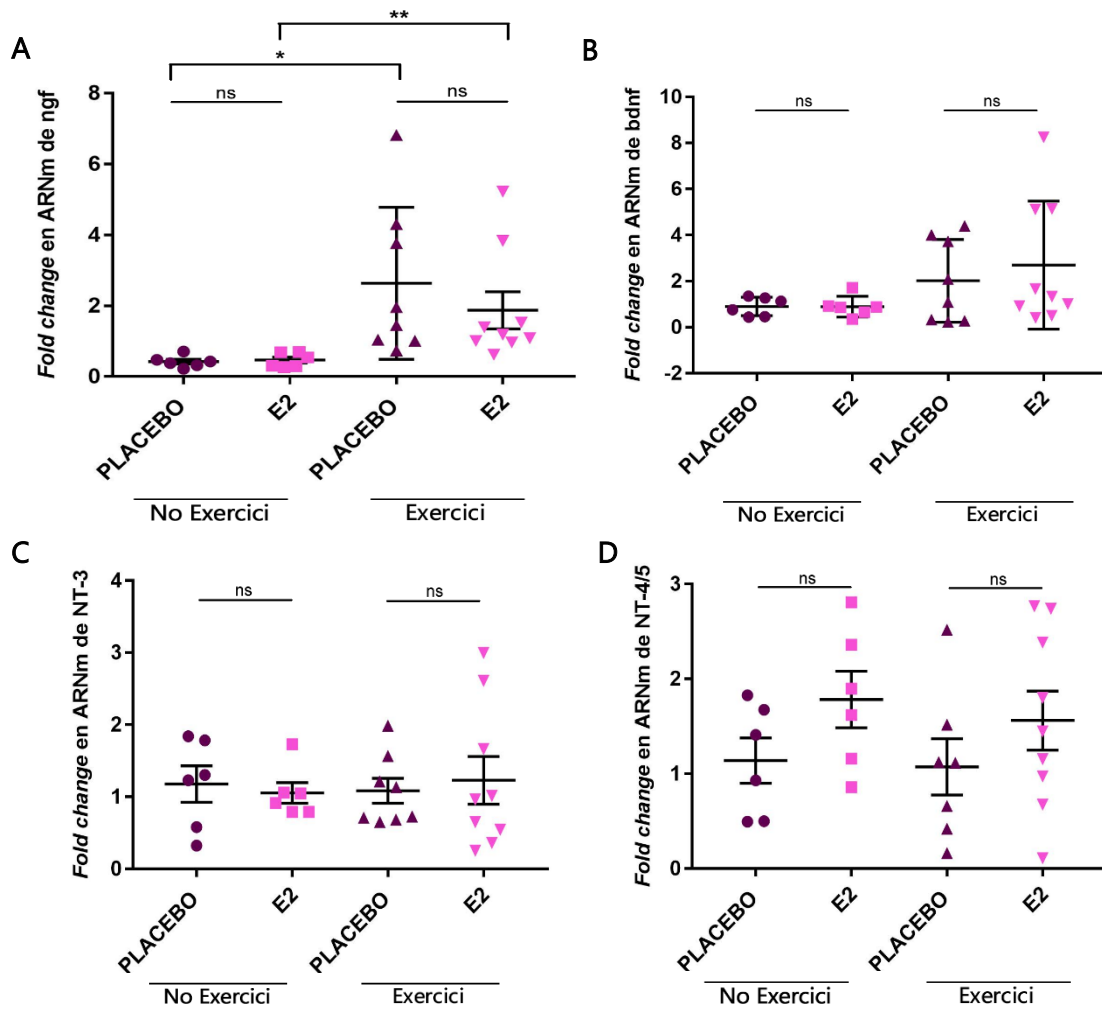
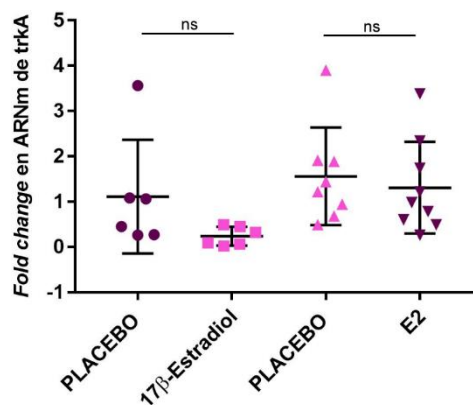


Figura 62: Valors de canvi d'expressió per les neurotrofines.

(A) Valors d'expressió de l'ARNm de NGF. La diferència entre els placebos de les dues rondes de tractament és significativa (*, p-valor: 0,0280) i també entre els tractats amb E2 (**, p-valor: 0,016). (B) Valors d'expressió de l'ARNm de BDNF. Segueix la mateixa tendència entre rondes que el NGF però no arriben a ser canvis significatius. (C) Valors d'expressió de l'ARNm de NT-3. (D) Valors d'expressió de l'ARNm de NT4-5.

- I pel que fa a l'altre receptor de neurotrofines, TrkA, tampoc s'observen diferències significatives d'expressió entre les condicions (figura 63).

Figura 63: Valors de canvi d'expressió pel receptor trkA.



Estudi en les biòpsies humanes, com està p75^{NTR}?

Degut a l'elevat interès que té p75^{NTR} per les seves possibles funcions en el múscul esquelètic, es va voler veure quina era la seva expressió i localització en el múscul de pacients amb Distrofia Muscular de Duchenne, pel que es va realitzar una immunofluorescència amb doble marcatge p75^{NTR}-utrofina igual que la prèvia en ratolins.

En les imatges que es presenten a continuació s'observa un augment de p75^{NTR} en les fibres dels pacients amb DMD respecte a un múscul control, així com també l'expressió d'utrofina en les fibres regenerants també dels pacients. La localització de p75^{NTR} en biòpsies humanes co-localitza amb la membrana d'alguna fibra però sobretot amb força nuclis cel·lulars, tal i com es pot veure a la figura 64.

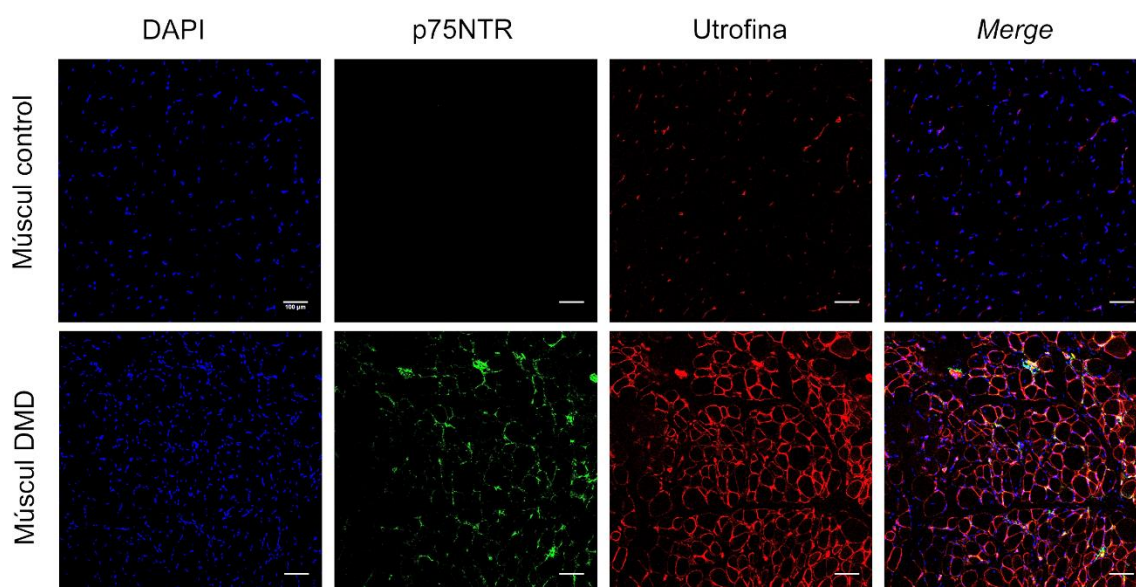


Figura 64: Immunofluorescència per p75^{NTR} i utrofina.

La proteïna p75^{NTR} en el múscul esquelètic de pacients es localitza a la membrana d'algunes fibres però sobretot en nuclis (tenyits amb DAPI). L'escala equival a 100µm.

Igual que en la immunofluorescència anterior, es van quantificar una mijta de 200 fibres de seccions de 4 pacients amb DMD i 4 controls, amb l'ajuda del software ImageJ, el número de fibres positives i l'àrea d'aquestes. La figura representa els resultats obtinguts d'aquesta quantificació, en el que el número de fibres positives és molt superior en pacients amb DMD que en els controls i es produeix una disminució de la mida de les fibres tan positives com negatives en els pacients amb DMD que resulta molt significativa (figura 65).

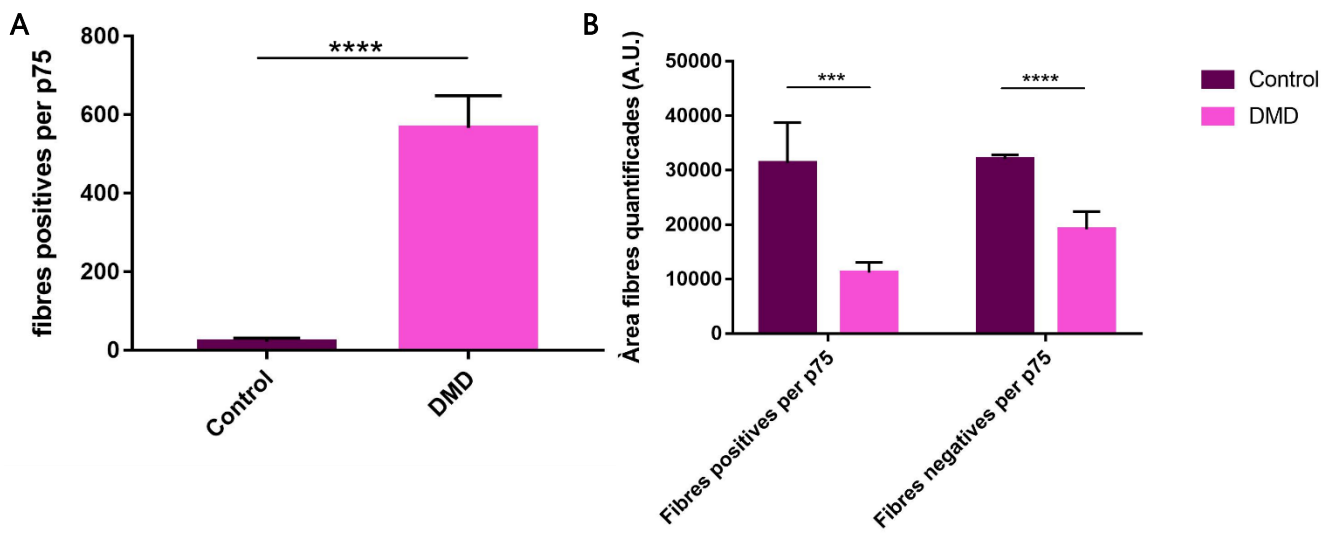
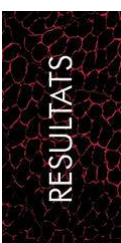


Figura 65: Quantificacions de la immunofluorescència per p75^{NTR}.

(A) Fibres positives per p75^{NTR}, amb valors de mitjana de 22 ± 9,51 pels placebo i de 567 ± 81,9 pels E2 i amb un (****) p-valor < 0,0001 i (B) àrea de les fibres quantificades. Comparació àrea fibres positives Control-DMD, (***) p-valor = 0,0002; i comparació àrea fibres negatives Control-DMD, (****) p-valor < 0,0001.





4.2 RESULTATS DEL TRACTAMENT AMB LM11A-31

Per tal de confirmar la hipòtesi de que els estrògens estaven atenuant el fenotip distròfic a través de l'acció de p75^{NTR}, es van tractar ratolins *mdx* amb LM11A-31, un fàrmac que és agonista parcial de p75^{NTR}, seguint el disseny de la figura 66.

Es va fer un seguiment de l'evolució i el pes de tots els animals, per determinar que el fàrmac no alterava el creixement i es va comprovar que tots els animals van créixer al mateix ritme (figura 66).

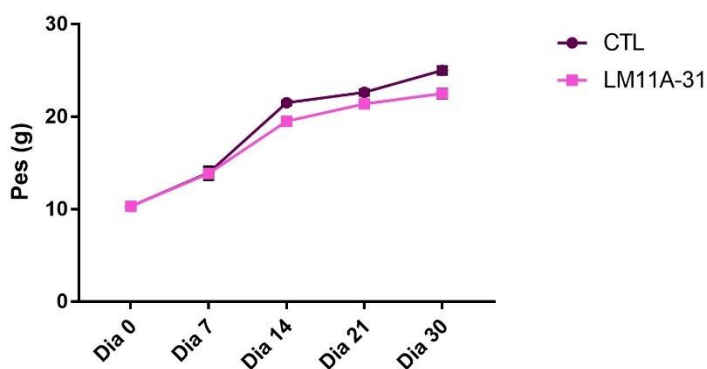


Figura 66: Evolució del pes dels animals al llarg del tractament.

Els dos grups d'animals presenten una corba de creixement molt semblant.

Tests funcionals

Els animals d'aquest tractament també van realitzar els tests funcionals un cop per setmana, per tal de veure si es produïa algun canvi en el rendiment físic dels animals.

El primer test, el de suspensió per dues extremitats, els resultats revelen que no hi ha diferències significatives en cap moment del tractament i no es veu una evolució clara en els dos grups de tractament. Tot i això, en el pic màxim de necrosi-regeneració (als 14 dies de tractament i 5 setmanes de vida), els animals tractats amb LM11A-31 presenten una millor coordinació corporal i aguanten més temps que els animals control (figura 67).

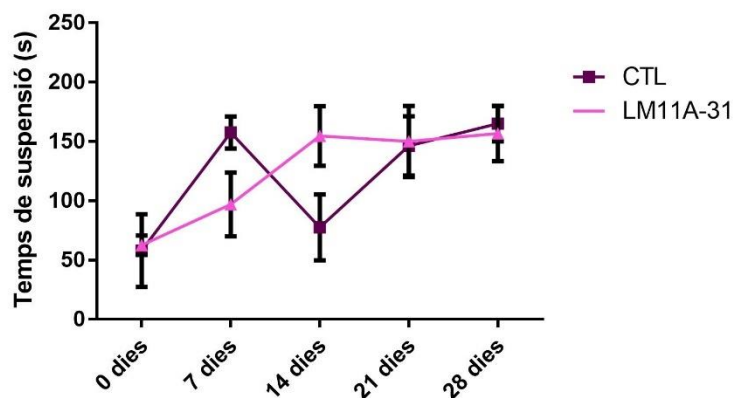


Figura 67: Gràfic representatiu del Test de suspensió per dues extremitats al llarg del tractament.

l pel que fa al test de suspensió de quatre extremitats, s'observen diferències significatives als 14 i 21 dies de tractament, en els que els animals tractats amb LM11A-31 aconseguen assolir uns temps més alts de suspensió (figura 68).

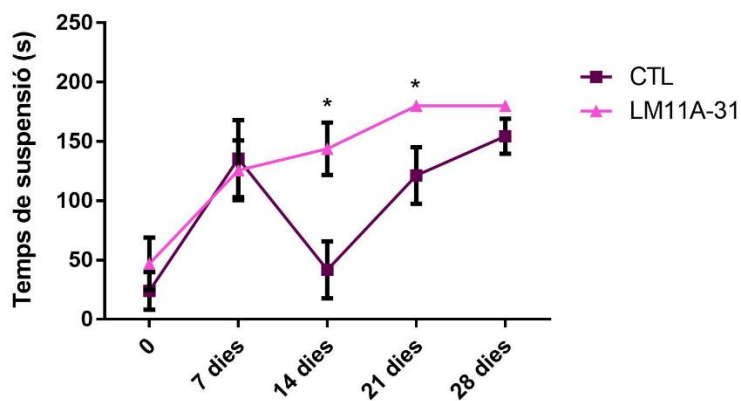


Figura 68: Gràfic representatiu del test de suspensió per quatre extremitats al llarg del tractament.

Anàlisi de característiques del fenotip deficient en distrofina

El primer que es va realitzar va ser comprovar si el tractament amb LM11A-31 aconseguia modificar els trets distròfics propis del fenotip, comprovant els nivells de Creatina Quinasa en plasma i fent un estudi histològic del múscul quàdriceps.

Pel que fa als nivells de CKs obtinguts (taula 21), es va observar una disminució dels nivells de CKs en els animals tractats, tot i que, aquesta diferència no arribava a ser estadísticament significativa (veure figura 69).

Taula 21: Valors dels nivells de CKs en sang (U/l)

Control	LM11A-31
23611	16862,7
3450,1	6131,3
68590	7204,1
45789	11450,3

Els valors de la mitja que s'obtenen d'aquests són 35360 ± 14051 U/l pels control i 10412 ± 2438 U/l pels LM11A-31.

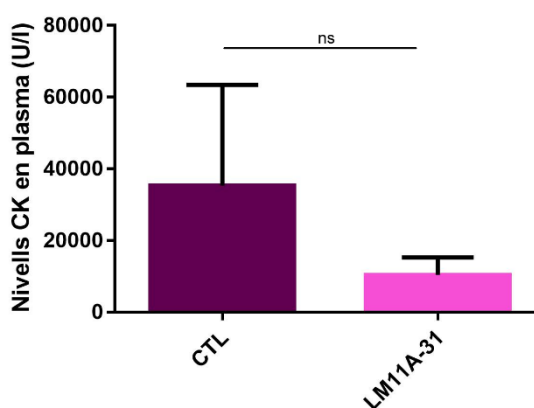


Figura 69: Nivells de CKs en plasma.

En l'estudi histològic del múscul quàdriceps dels animals d'aquest tractament, també es van estudiar les característiques principals del múscul distròfic. No es van observar diferències pel que fa a nombre i estat dels GDRs, àrees de infiltració de cèl·lules immunitàries i nombre de fibres amb nuclis centrals entre les dues condicions. A la figura 70 podem veure exemples de aquests trets característics en els músculs d'estudi.

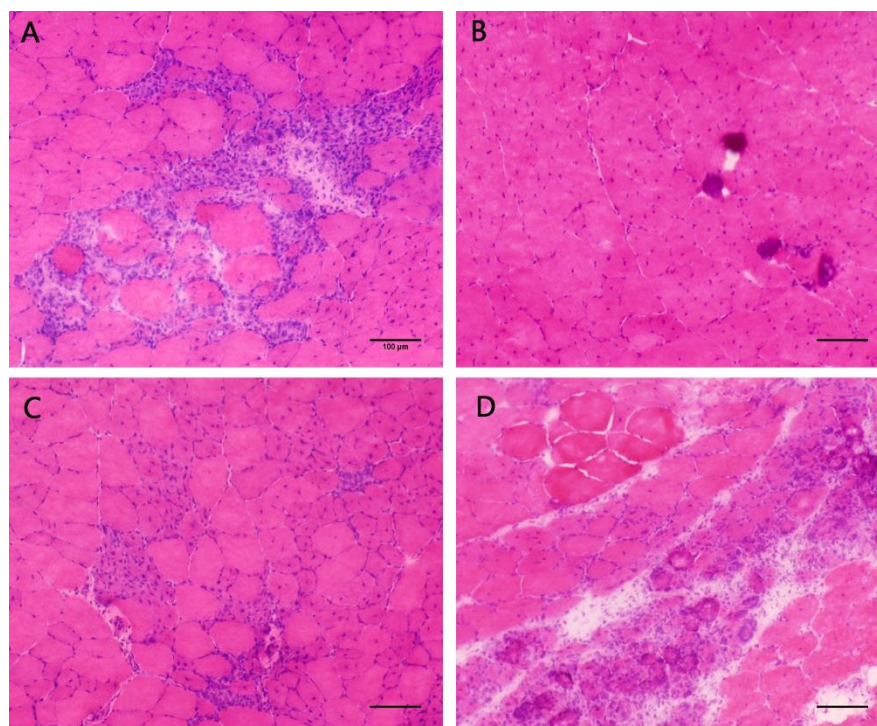


Figura 70: Estudi histològic del quàdriceps dels ratolins del tractament amb LM11A-31

Representació de diferents trets de la patologia. (A) GDR en estat de necrosi. (B) Petita zona d'infiltració de cèl·lules immunitàries. (C) GDR en fase de regeneració (*). (D) Gran zona de necrosi i infiltració de cèl·lules immunitàries. L'escala correspon a 100µm.

Estudi del metabolisme del calci

Per tal d'estudiar si el fàrmac LM11A-31 influeix en l'homeòstasi del calci en el model animal *mdx*, com d'alguna manera sembla que ho fa l'E2, es van realitzar diferents estudis moleculars i histològics amb mostres dels animals tractats.

El primer de tot, es va fer la tinció d'Alizarin Red S, en talls de quàdriceps de tots els animals però no es van apreciar diferències ni a nivell histològic, ni en el comptatge de punts d'acúmul de $[Ca^{2+}]_i$ (figura 71).

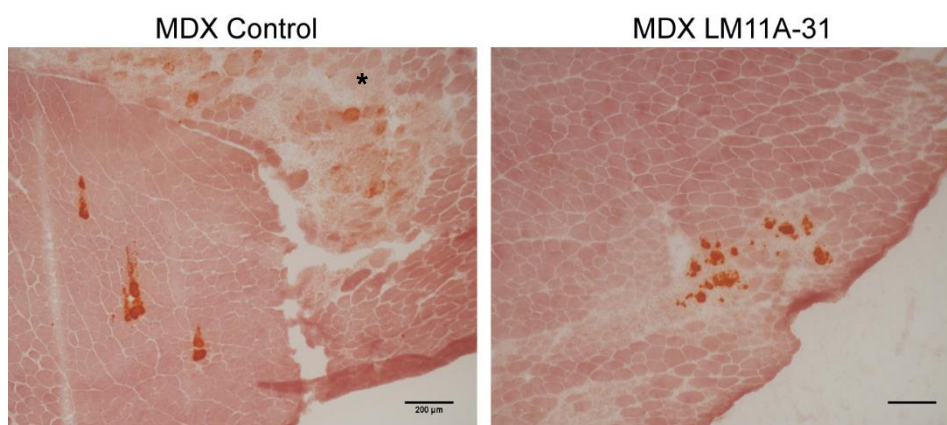


Figura 71: Tinció Alizarin Red S en múscul quàdriceps.

Els acúmuls es presenten com els punts roig-ataronjats més forts. A més, en les zones on les fibres estan necrosant (*) es presenta una coloració més taronja. L'escala equival a 200μm.

A continuació, es van fer els anàlisis moleculars seleccionant els gens per estar relacionats amb el maneig de calci al Reticle Sarcoplasmàtic: RyR1, SERCA1a i SERCA2a, com en el tractament anterior. Els resultats d'expressió van revelar el mateix que la tinció d'Alizarin Red S: no hi va haver diferències entre les dues condicions en cap dels gens estudiats (RyR1, SERCA1a i SERCA2a) ni entre el quàdriceps i el diafragma. Pel que fa al nivell de proteïna, RyR1 també va ser estudiat per Western Blot, però no es van produir canvis entre els animals tractats LM11A-31 i animals de control. Aquests resultats es representen a la figura B, i les anàlisis quantitatives a la figura C, de l'annex.

Com està l'expressió de p75?

Com el fàrmac LM11A-31 és un compost agonista parcial del receptor p75^{NTR} que actua desplaçant la neurotrofina NGF del lloc d'unió al receptor, és interessant saber quins són els nivells d'expressió d'aquests dos gens en els nostres animals. Es va realitzar una PCR a temps real dels 4 animals de cada condició i dels resultats se'n va extreure que hi ha una disminució no significativa de l'expressió de p75^{NTR} i que no es produeixen canvis en els nivells de Ngf (figura 72).

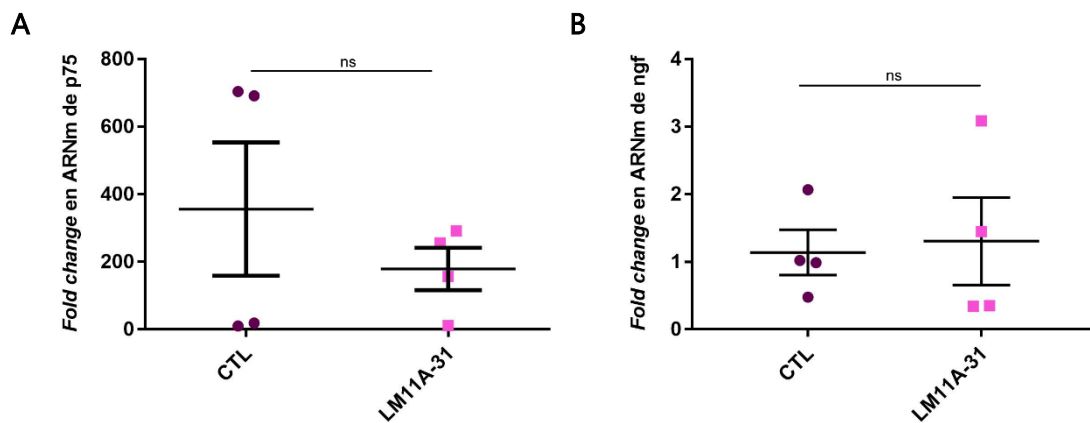


Figura 72: Valors de canvi d'expressió per p75^{NTR} i Ngf.

(A) Expressió de p75^{NTR} en les diferents condicions. Els valors de la mediana observats són de 355,66 (12,8 – 701,1) pels control i de 206,6 (47,79 – 282,9) pels tractats amb LM11A-31 (B) Expressió de MyoD en les diferents condicions. Els valors de la mitjana observats són de 1,14±0,3341 pels control i de 1,308±0,648 pels tractats amb LM11A-31.

El tractament de LM11A-31 aconsegueix modificar l'expressió d'alguns gens com el tractament de E2?

Es va voler confirmar si el nou tractament aconseguia modificar l'expressió dels gens relacionats amb la miogènesi que prenen valor amb el tractament anterior, com és el cas de la miogenina, la miostatina o els marcadors de cèl·lules satèl·lit, Pax7 i MyoD.

En cap cas, es van observar canvis en l'expressió gènica de cap d'aquests gens d'interès.

Els resultats revelen:

- Una tendència contrària al tractament d'E2 en l'expressió de la miogenina. En els animals de LM11A-31 hi ha una disminució dels valors d'expressió. La representació gràfica es troba a figura D de l'annex.

- La miostatina tendeix a augmentar en els animals tractats amb LM11A-31 (Figura D de l'annex).
- No s'observen canvis d'expressió en l'ARNm de MyoD i una lleugera disminució en els de Pax7 pels ratolins LM11A-31, com es pot veure a la figura E de l'annex.

Sembla evident que el tractament amb LM11A-31 no produeix els mateixos canvis atenuants en els animals *mdx* que el tractament amb E2.

4.3 RESULTATS DEL TRACTAMENT AMB PTC124 I NPs

4.3.1 Tractament amb PTC124 intraperitoneal

A causa de la controvèrsia existent, prèviament exposada a la introducció, al voltant de l'eficàcia del PTC124 per restablir la distrofina en DMD i amb els resultats obtinguts en l'apartat anterior, es va decidir replicar l'experiment en ratolins *mdx in vivo* realitzat per PTC Therapeutics⁹³. Pel que es tracten ratolins *mdx* intraperitonealment amb PTC124 i el seu vehicle (DMSO) durant dues setmanes.

Tests funcionals

Els animals d'aquest tractament van realitzar els tests funcionals: abans de començar i un cop cada setmana. Els resultats es mostren a la figura 73 i revelen que en el test de suspensió per dues extremitats, els animals tractats semblen tenir una tendència a millorar el seu rendiment, però, d'altra banda, el test de suspensió per quatre extremitats mostra resultats superposats entre els grups tractats i control.

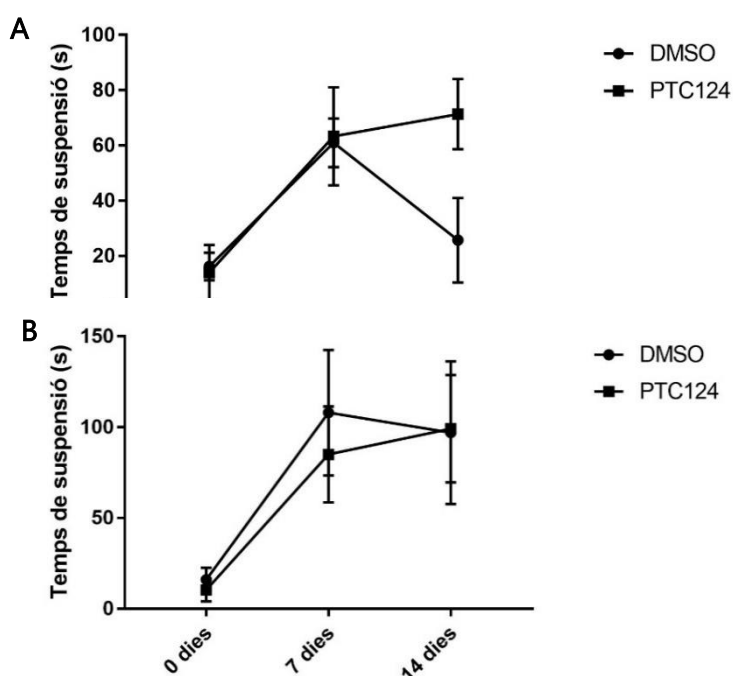


Figura 73: Gràfic representatiu del Test de suspensió per dues (A) i quatre extremitats (B) al llarg del tractament.

Estudi de l'expressió de la distrofina a nivell proteic

A part de saber si les MSNsPEG arriben al múscul esquelètic, la importància del tractament també resideix en avaluar l'efecte de PTC124 reestablint l'expressió de distrofina. Amb les mostres d'aquests animals es va realitzar el mateix que en el experiment anterior, una immunofluorescència i un Western Blot per distrofina. Els resultats obtinguts no mostren un augment en l'expressió de distrofina en els músculs GMG de ratolins *mdx* tractats amb PTC124 intraperitonealment durant dues setmanes, en comparació amb el grup injectat amb el vehicle (DMSO) (figura 74). Les imatges de la immunofluorescència mostren la presència de fibres revertents en ambdós grups.

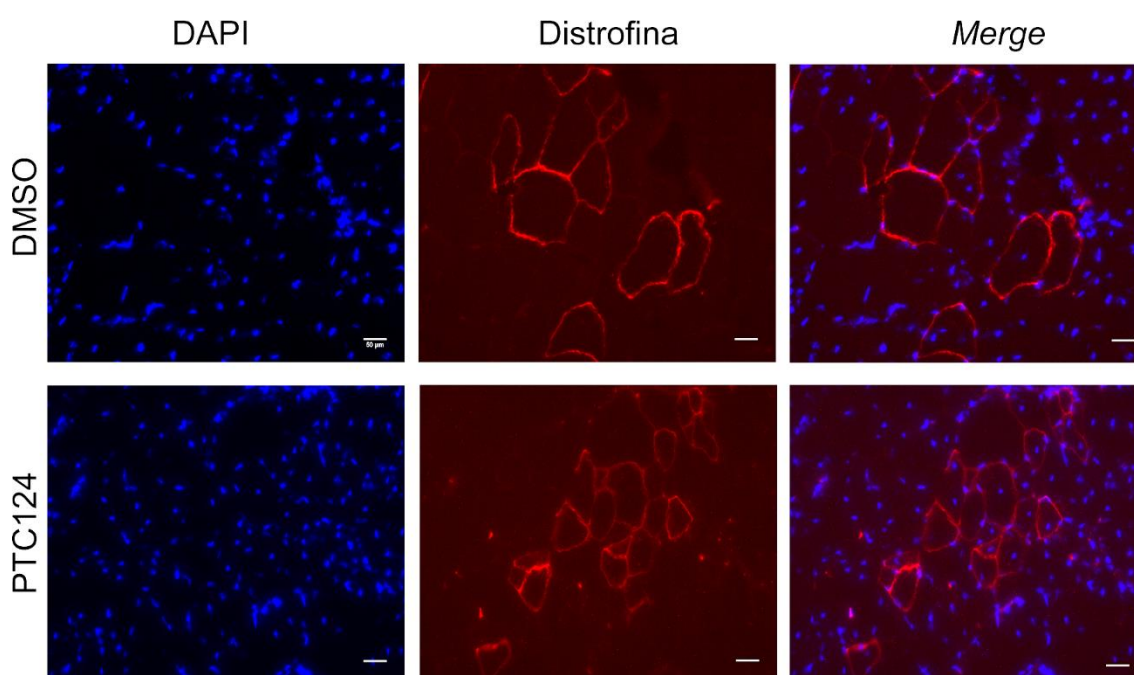


Figura 74: Immunofluorescència per distrofina.

Totes les seccions estudiades presenten punts de fibres revertents, positives per distrofina. A més es poden observar els nuclis tenyits amb DAPI. L'escala correspon a 50µm.

Es van comptar les fibres distrofina positives per tots els animals, igual que en els experiments anteriors i es va observar que els animals injectats amb DMSO presentaven més fibres positives per distrofina, sent significativa aquesta diferència (figura 75).

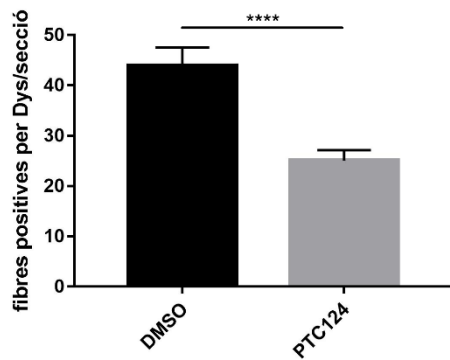


Figura 75: Quantificació de les fibres positives.

Els resultats es presenten per la mitja de fibres positives per secció, trobant una mitja de 43 (29,75 – 57,75) fibres positives per secció en els tractats amb vehicle i de 20 (13 – 33) pels tractats amb PTC124 amb un (****) p-valor < 0,0001.

El resultat del Western blot mostrava que aquesta expressió de distrofina en fibres revertents no és suficient com per ser observada amb aquesta tècnica, el que demostra que no es produïa un augment efectiu de la proteïna (figura 76).

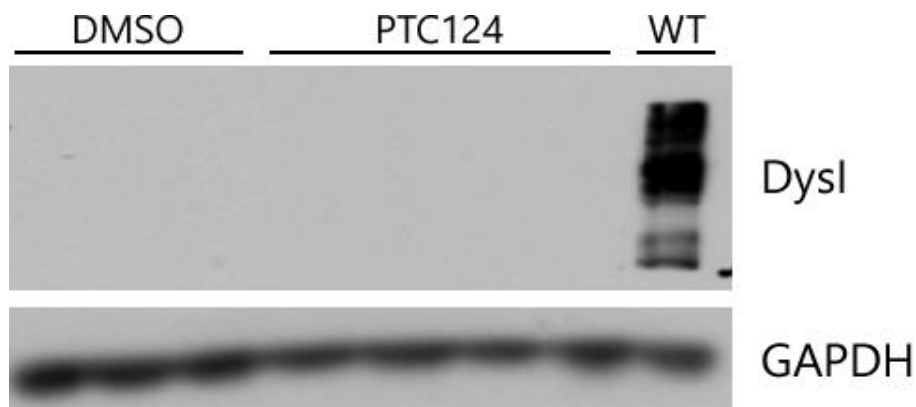


Figura 76: Resultat del WB per distrofina.

Només s'observava marcatge en el control positiu utilitzat, un animal *wt*. En aquest cas, es va utilitzar GAPDH com a control de càrrega.



4.3.2 Ús de nanopartícules de primera generació

La hipòtesi del laboratori del grup que explicava la falta d'eficàcia del PTC124 per restablir i augmentar la quantitat de distrofina va ser que el fàrmac no aconseguia arribar al múscul esquelètic amb aquesta forma d'administració. És per això que es va plantejar canviar de vehicle per intentar millorar l'arribada a l'òrgan diana, utilitzant nanopartícules.

Anàlisi de biodistribució

Per avaluar si les primeres nanopartícules (MSNs) proveïdes per l'Institut Químic de Sarrià (IQS) eren un bon vehicle per dur fàrmacs al múscul esquelètic inflamat, es va injectar 100µl de MSNs a una concentració de 4µg/µl per la vena de la cua de ratolins *mdx* i *wt*, utilitzant un animal no injectat com a control negatiu. Prèviament a aquesta administració, es va induir un episodi de necrosi i inflamació aguda a l'extremitat posterior dreta d'un dels animals *wt* mitjançant la injecció de CTX, tal i com s'explica en l'apartat 3.2.3.3.

Aquests MSNs van ser funcionalitzades amb un marcatge fluorescent, cosa que permet observar la seva biodistribució detectant l'emissió de tot l'animal *in vivo* també l'emissió que emeten els teixits *ex vivo* utilitzant el Xenogen IVIS[®] Spectrum System. S'escaneja un control negatiu per veure l'emissió de base que presenten aquests animals ja que la pell de la soca de ratolins que s'utilitzen en aquests experiments emet grans quantitats de fluorescència. En conseqüència, no és possible establir la distribució exacta de les MSNs en tots els òrgans de l'animal basant-se en la detecció *in vivo* (figura 77). Per aquesta raó, la quantificació de la biodistribució de les MSNs s'ha realitzat en els teixits *ex vivo* en tots els experiments.

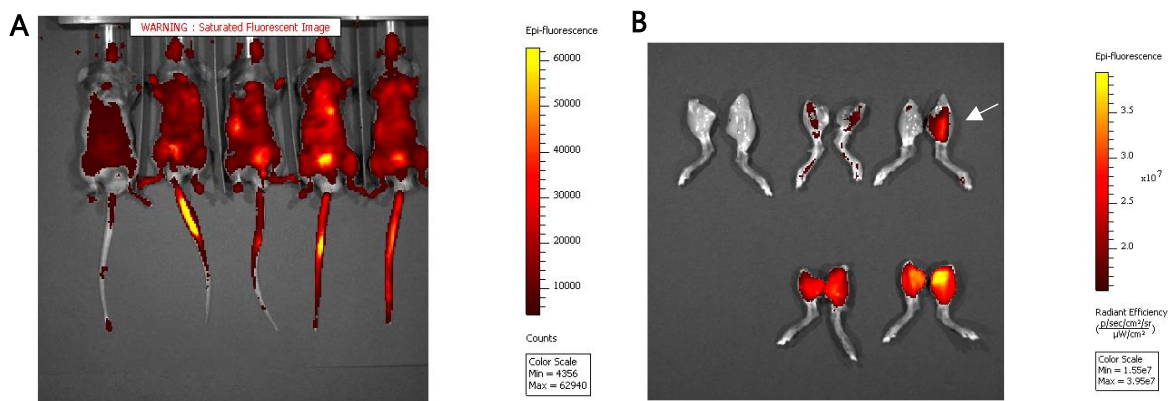
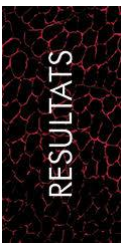


Figura 77: Imatges de l'escanejat *in vivo* (A) i *ex vivo* de les extremitats posteriors dels ratolins (B).

A totes les imatges *ex vivo*, s'elimina la fluorescència dels òrgans del control negatiu per tal de quantificar la fluorescència emetida real derivada només del MSNs. A la figura 77 es mostra el resultat de l'escanejat de les extremitats posteriors dels animals als 30 minuts post-injecció. Com s'aprecia a la imatge es produïa una acumulació de les MSNs en el múscul esquelètic inflamat, tant en la inflamació aguda induïda per CTX en el ratolí *wt*

(fletxa) com en la inflamació crònica present en els ratolins *mdx*.

La quantificació de la fluorescència de les extremitats posteriors, tal i com ha estat descrita a la secció de materials i mètodes, confirma que les MSNs de primera generació tenen tendència a acumular-se al múscul esquelètic inflammat (figura 78).

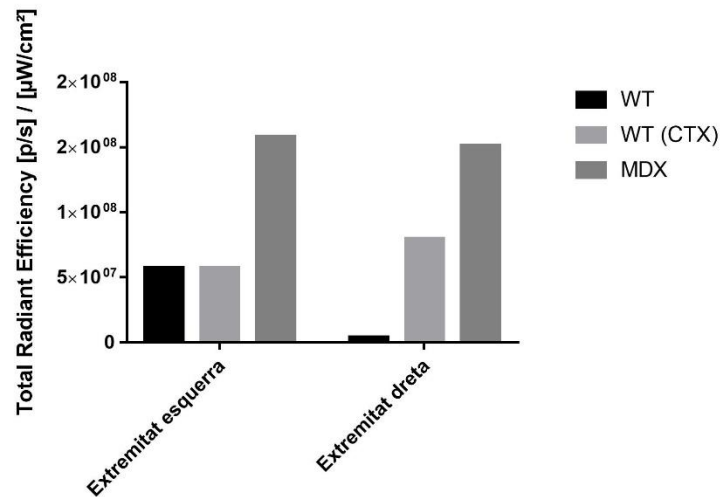


Figura 78: Quantificació de la fluorescència emesa per les extremitats posteriors.



Es van analitzar els altres músculs esquelètics: diafragma i extremitats anteriors; a més del cor i el cervell (òrgans també afectats en DMD). La figura 79 mostra l'acumulació de MSNs en aquests òrgans per tots els animals, sent més evident l'acumulació a cervell.

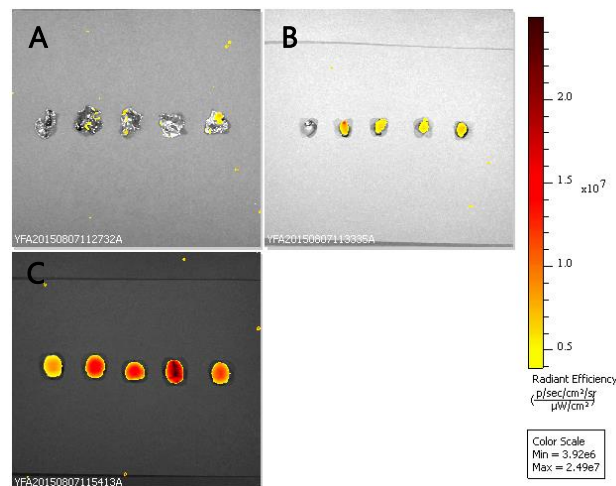


Figura 79: Imatge de la fluorescència emesa pel diafragma (A), cor (B) i cervell (C).

Els macròfags capturen les nanopartícules de sílice¹¹³, pel que es van analitzar òrgans del sistema mononuclear fagocític (MPS), és a dir, el fetge, la melsa i els pulmons, per a la possible acumulació de MSN. A més, atès que les MSNs utilitzades tenen una eliminació

principalment renal¹¹³, també es va determinar la fluorescència dels ronyons.

A la figura 80, es pot veure una evident presència de MSNs principalment en pulmons i fetge de tots els animals injectats, possiblement per la captura dels macròfags. La bufeta (dades no mostrades) també mostra una marcada acumulació, fet que indica una alta eliminació de MSNs 30 minuts després de la injecció.

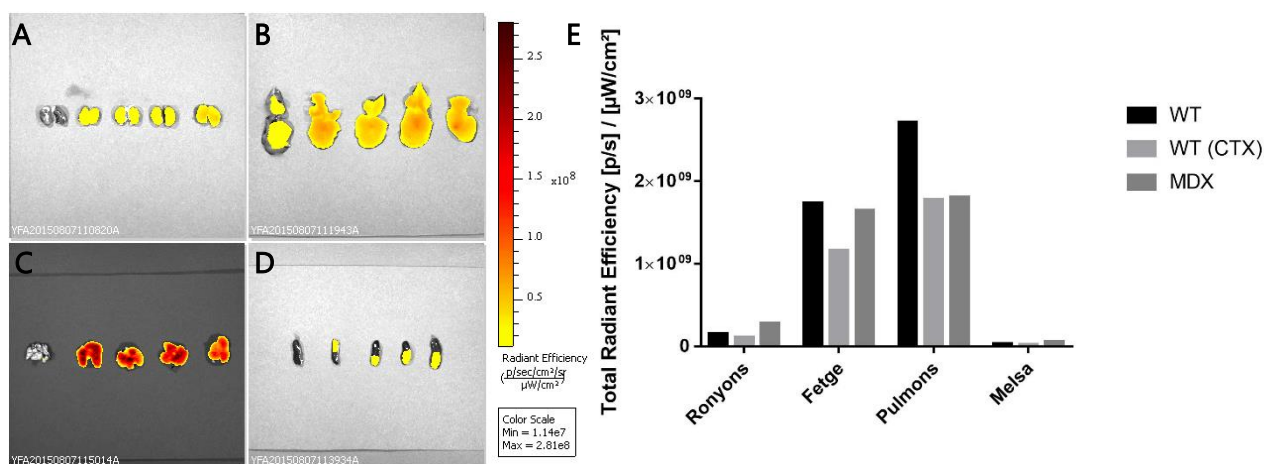


Figura 80: Imatge de la fluorescència emesa pels ronyons (A), fetge (B), pulmons (C) i melsa (D), òrgans de rebuig i del sistema mononuclear fagocític. (E) Quantificació d'aquesta fluorescència.

4.3.3 Ús de les nanopartícules de segona generació

Veient que les primeres NPs van mostrar una velocitat d'eliminació massa ràpida i utilitzades s'acumulaven molt als òrgans d'eliminació del fàrmac i que, tot i que arribaven als músculs inflamats, podia ser que no ho realitzessin en suficient quantitat, es van funcionalitzar les NPs afegint molècules de PEG.

Anàlisi de biodistribució

Les MSNs PEGilades (MSNsPEG) solen acumular-se menys als òrgans del sistema mononuclear fagocític (MPS, sigles en anglès), es mantenen més temps en el corrent sanguini i tenen una taxa d'excreció més lenta després d'una administració intravenosa.¹⁵⁶ Per tal de veure la distribució d'aquestes NPs, es va injectar les MSNsPEG en un ratolí *wt* al que prèviament se li havia creat un episodi de necrosi aguda per injecció de CTX al GMG dret.

Amb l'anàlisi d'aquest animal es va poder veure que les MSNsPEG seguien tenint tropisme per la zona inflamada, com es pot veure a la figura 81.

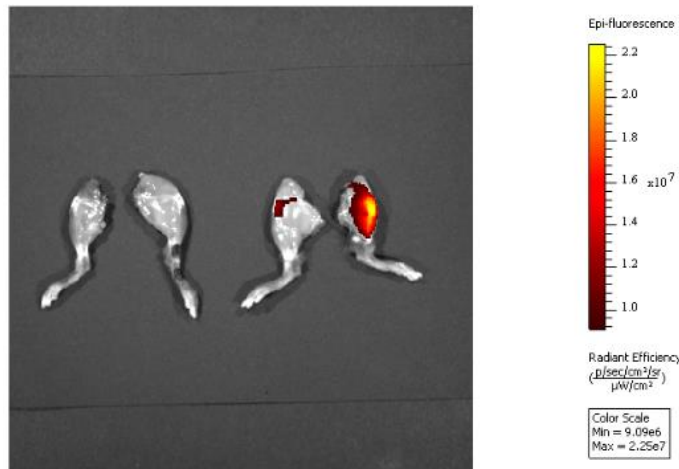


Figura 81: Escanejat *ex vivo* dels dos animals *wt*. A la dreta, *wt* injectat amb MSNsPEG.

L'extremitat dreta d'aquest segon animal presenta acumulació de les MSNsPEG coincidint amb la necrosi-inflamació per la injecció de CTX.

Atès que les MSNsPEG es detecten en plasma fins de 4 a 8 hores després de la injecció, aquest experiment va ser dissenyat per veure la biodistribució a les 4 i 24 hores post-injecció. La figura 82 mostra la distribució homogènia de la fluorescència en l'animal sacrificat a les 4 hores post-injecció. Per contra, el que es va sacrificar a les 24 hores, mostra una evident acumulació a la cua, per on es realitza la injecció, el que indica que les MSNsPEG probablement no van arribar al torrent sanguini provocant, per tant, una distribució incorrecta per tot el cos. Per aquest motiu l'anàlisi *ex vivo*, només es realitza en l'animal sacrificat a les 4 hores post-injecció.

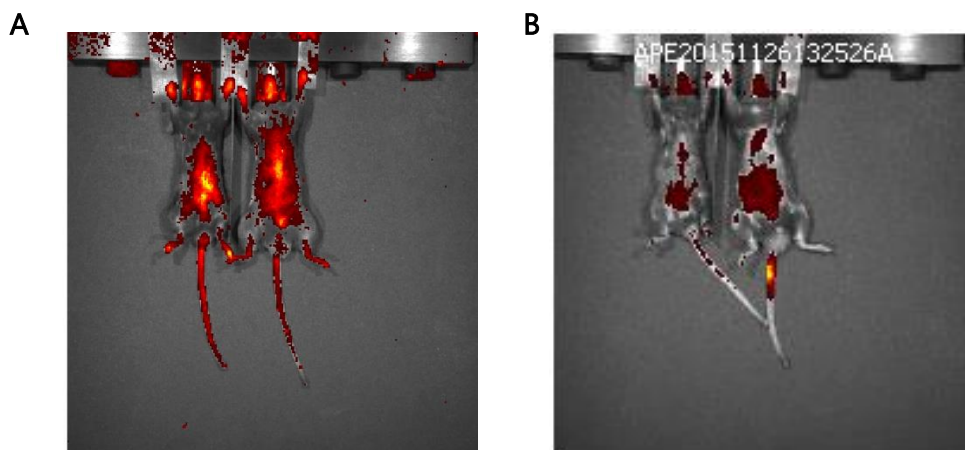


Figura 82: Escanejat *in vivo* dels animals injectats amb MSNsPEG 4 hores (A) i 24 hores (B) abans del sacrifici.

En l'animal injectat 24 hores abans de l'escanejat s'observa l'acúmulo de nanopartícules a la cua (fletxa).

A la figura 83, es representen l'emissió de la fluorescència dels músculs esquelètics, els resultats dels quals suggereixen que les MSNsPEG també tenen afinitat pel múscul esquelètic inflammat dels ratolins *mdx*, aprofitant l'efecte EPR.

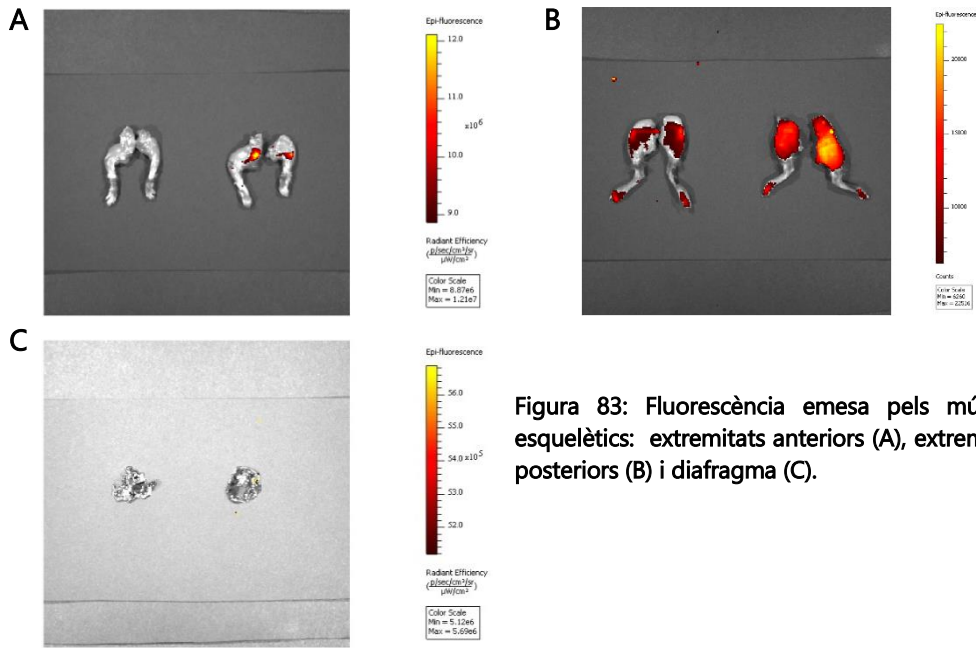


Figura 83: Fluorescència emesa pels músculs esquelètics: extremitats anteriors (A), extremitats posteriors (B) i diafragma (C).

També es va analitzar la fluorescència del cor i del cervell en els animals de 4 hores i les imatges presentades a la figura 84, demostren només el cor presenta una baixa emissió de fluorescència per les MSNsPEG.

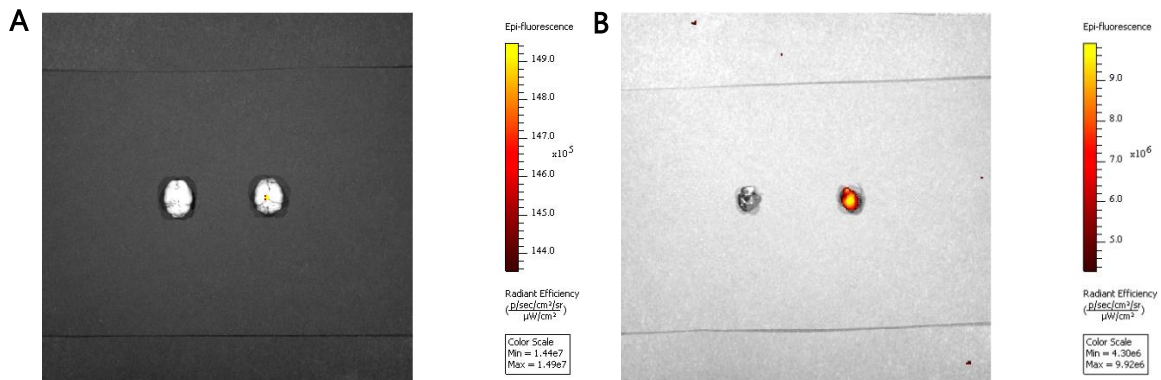


Figura 84: Fluorescència emesa pels altres òrgans afectes en el model deficient en distrofina *mdx*: cervell (A) i cor (B).

L'emissió de fluorescència dels òrgans del MPS i els ronyons està representada a la figura 85. En aquest escanejat *ex vivo*, s'observava una emissió més elevada per part de l'animal injectat amb MSNsPEG a tots aquests òrgans. Sobretot, s'observa molta acumulació a fetge i pulmons.

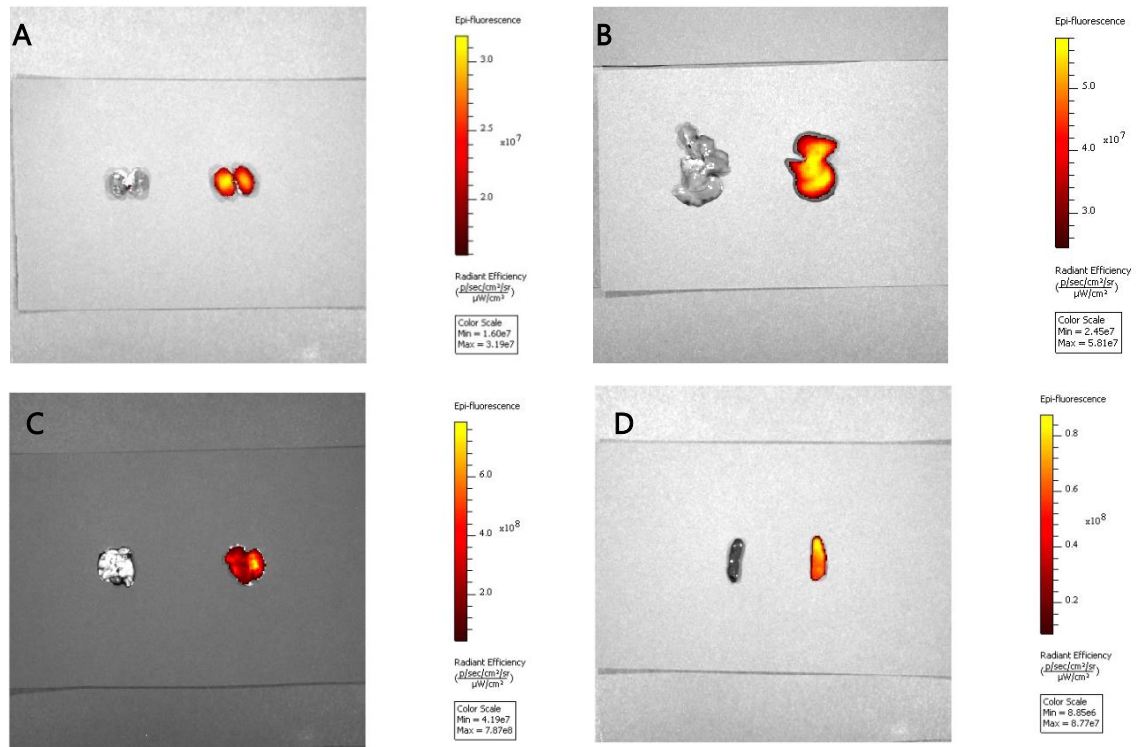


Figura 85: Imatge de la fluorescència emesa pels ronyons (A), fetge (B), pulmons (C) i melsa (D), òrgans de rebuig i del sistema mononuclear fagocític.

RESULTATS

4.3.4 Tractament amb NPs carregades am PTC124

Després de confirmar que les MSNsPEG també tenen afinitat pel múscul esquelètic inflammat, es van utilitzar aquestes nanopartícules per provar l'efecte de PTC124, carregant-les amb el fàrmac.

Anàlisi de biodistribució

Es va avaluar, com en els experiments anteriors, la presència de MSNsPEG carregades amb PTC124 i no carregades a través de l'emissió de fluorescència de cada òrgan. La presència de la droga al múscul esquelètic *in vivo* no es va poder avaluar, ja que el marcatge fluorescent corresponia a les MSNsPEG i el fàrmac no estava marcat. Es van

tractar 3 ratolins *mdx* amb MSNsPEG i 3 més, amb MSNsPEG carregades amb PTC124 (MSNsPEG-PTC), utilitzant ratolins *mdx* com a controls de fluorescència. El sacrifici i les mesures es van dur a terme 24 hores després de l'última injecció.

La figura 86 mostra petites diferències entre els controls i els animals tractats pel que fa a l'emissió de fluorescència *in vivo*. Les cues dels animals tractats mostren una emissió més alta que els controls, el que indica que es van realitzar correctament les injeccions.

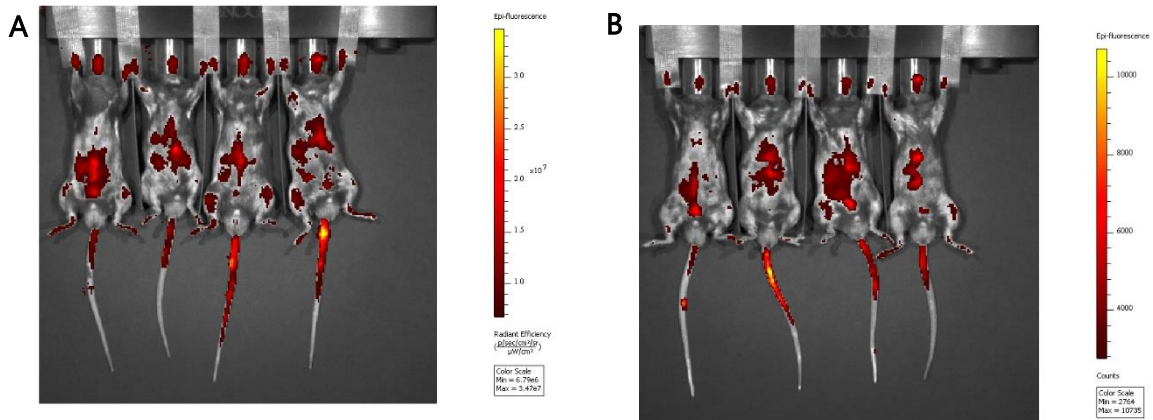


Figura 86: Escanejat dels animals *in vivo*. (A) Animals injectats amb MSNsPEG, i (B) animals injectats amb MSNsPEG-PTC durant 4 setmanes.

Cap dels òrgans afectats en DMD mostra emissions de fluorescència per presència de MSNsPEG ja sigui carregades amb fàrmac o no (figura 87). Només el diafragma del grup injectat amb vehicle mostra una major emissió de fluorescència que l'animal control, no injectat.

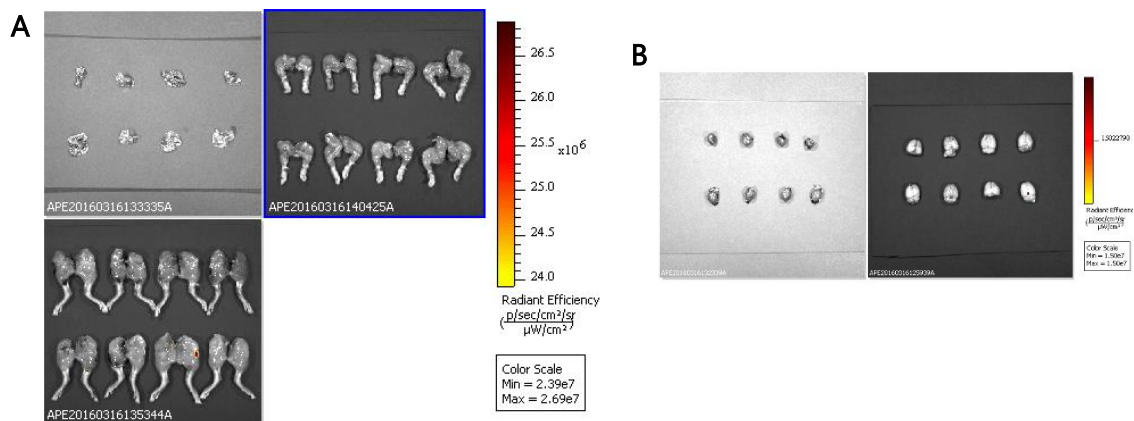


Figura 87: Fluorescència emesa pels músculs afectats en Dmd: diafragma, extremitats anteriors i extremitats posteriors (A) i, cor i cervell (B).

A la figura 88 es representen els resultats de l'emissió i la quantificació de la fluorescència dels òrgans del MPS i dels ronyons. En aquest cas, el fetge dels dos grups injectats presenta una emissió superior als animals control. La melsa també mostra emissions més altes en tots dos grups.

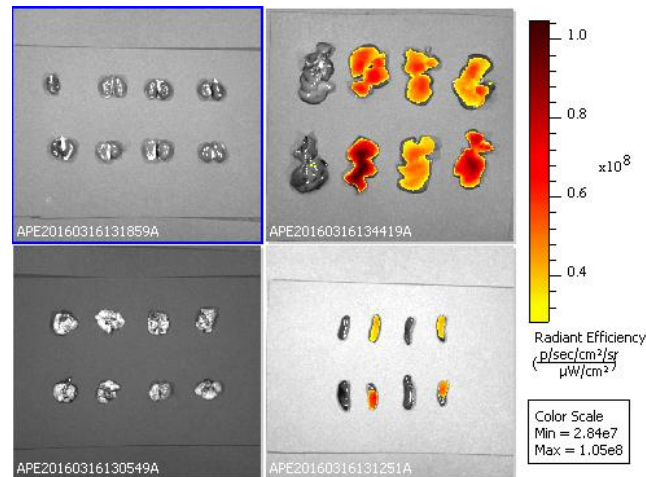


Figura 88: Fluorescència emesa pels òrgans de rebuig i del sistema MPS.

Tests funcionals

Per determinar el impacte en l'evolució clínica dels ratolins *mdx* per part del tractament amb MSNsPEG carregades amb PTC124 o no, s'han realitzat els mateixos tests funcionals que en els tractaments anteriors: el test de suspensió per dues extremitats i de quatre extremitats. Els temps de suspensió observats entre els grups de tractament no mostren diferències estadísticament significatives entre els grups tractats i els controls (figura 89). Els animals injectats tendeixen a millorar amb les setmanes però al final de l'estudi, acaben tenint un rendiment comparable. Pel que sembla que el tractament amb MSNsPEG amb i sense PTC124 no aconsegueix millorar l'estat físic dels ratolins *mdx*.

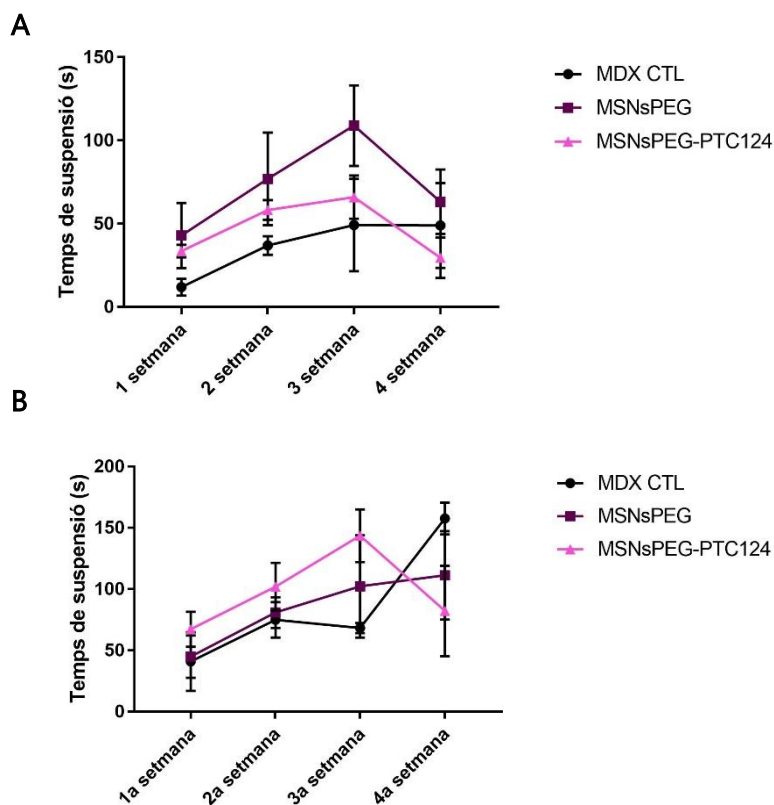


Figura 89: Gràfic representatiu del Test de suspensió per dues (A) i quatre extremitats (B) al llarg del tractament.

Presència de MSNsPEG en talls de múscul esquelètic

Com a assaig qualitatiu, els músculs gastrocnemis dels ratolins injectats amb nanopartícules es van tallar per avaluar directament la presència de les partícules fluorescents en el múscul esquelètic inflammat sota un microscopi de fluorescència confocal. En els talls d'animals injectats amb MSNsPEG i MSNsPEG-PTC durant 4 setmanes, no es va poder assegurar la presència de MSNsPEG a les seccions.

Estudi de l'expressió de la distrofina a nivell proteic

L'objectiu principal d'aquest tractament era veure si s'aconseguia restaurar l'expressió de distrofina. És per això que es va analitzar l'expressió de la proteïna en els ratolins tractats mitjançant immunofluorescència i Western Blot.

Per immunofluorescència es van analitzar seccions dels tres grups d'animals de l'experiment (control, MSNsPEG i MSNsPEG-PTC). Els resultats mostren que no existeixen diferències en l'expressió de distrofina (figura 90). Les imatges mostren la presència de fibres disperses positives per distrofina, iguals per tots els animals i que molt probablement es tracti de fibres revertents, presents en el model *mdx*¹⁵⁷. La seva presència per tant, no és atribuïble al fàrmac.

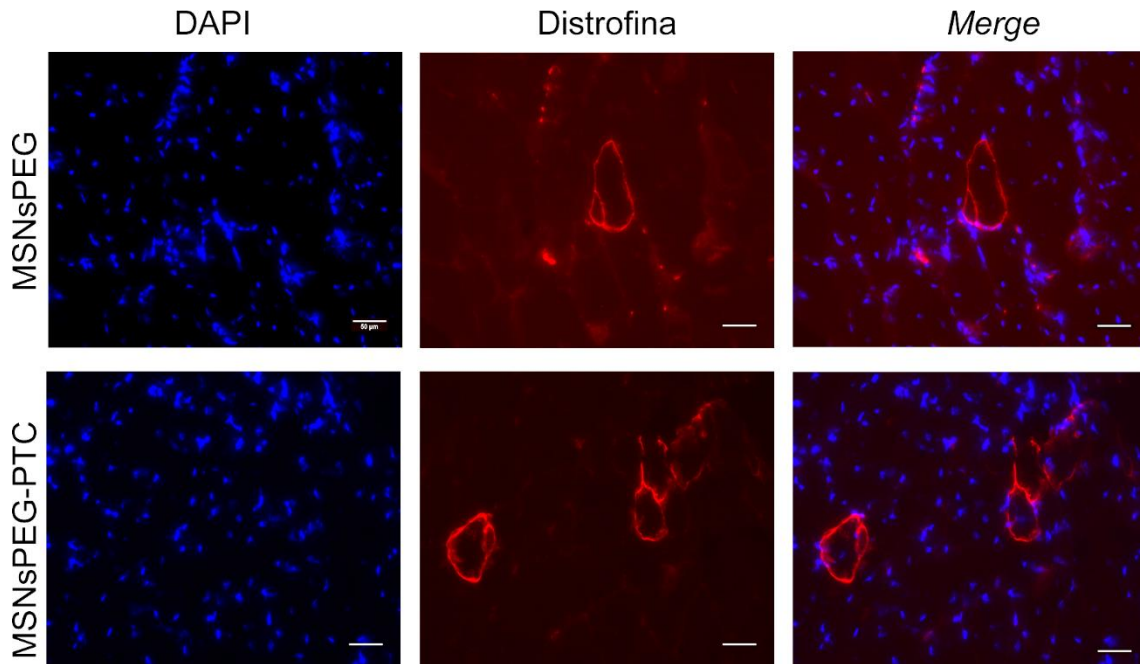


Figura 90: Immunofluorescència per distrofina en els animals injectats amb MSNsPEG i MSNsPEG-PTC.

En totes les seccions estudiades es poden observar fibres revertents, positives per distrofina i els nuclis tenyits amb DAPI. L'escala correspon a 50µm.

Es van comptar les fibres positives per distrofina en 10 seccions no consecutives de cada animal i no es van veure diferències d'expressió (figura 91).

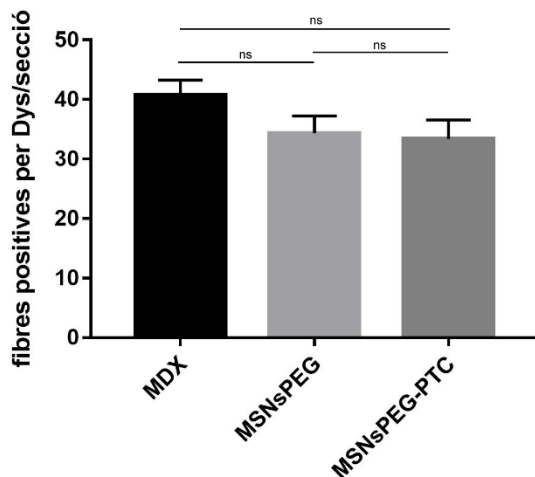


Figura 91: Quantificació de les fibres positives.

Els resultats es presenten per la mitja de fibres positives per secció, trobant una mitjana de 40,79±2,468 fibres positives per secció controls *mdx*, de 34,33±2,88 pels injectats amb MSNsPEG i de 33,38±3,17 pels injectats amb MSNsPEG-PTC.

A més, es va realitzar un Western Blot per visualitzar la quantitat de proteïna dels animals de l'experiment. Com es pot veure a la figura 92, els ratolins *mdx* injectats, ja sigui amb NPs carregades amb PTC o no, i no injectats no presenten un augment de la proteïna d'estudi.

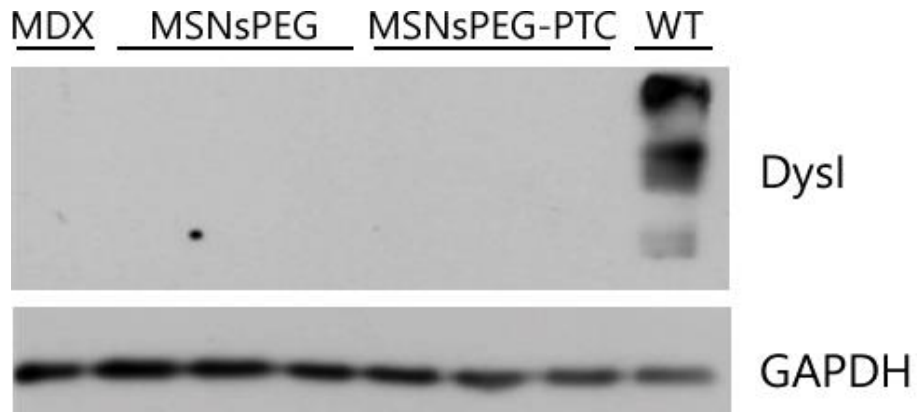


Figura 92: WB per sistrofina de les mostres del tractament amb MSNsPEG i MSNsPEG-PTC.

Només s'observava marcatge en el control positiu utilitzat, un animal WT. Es va utilitzar GAPDH com a control de càrrega.

4.4 RESULTATS DEL DIAGNÒSTIC GENÈTIC DE PACIENTS

AMB NMD

Resultats de les tècniques de NGS aplicades

Com ja s'ha comentat en l'apartat 1.2.1 de la introducció, el diagnòstic genètic requereix de la implicació prèvia de moltes disciplines mèdiques: neuròlegs pediatres, neuroradiòlegs, neuropatòlegs... Tots ells condueixen a un fenotip concret que, ben caracteritzat, facilita trobar-ne el genotip.

La dificultat del diagnòstic genètic dels trastorns neuromusculars radica, per una banda, en l'elevada heterogeneïtat gènica i fenotípica que els caracteritza. Per altra banda, els gens responsables d'aquestes malalties solen ser els més grans del genoma. És per això que l'abordatge que s'ha utilitzat fins al moment, el de seqüenciar gen per gen amb tècniques tradicionals, suposava un elevat cost econòmic i una inversió considerable de temps, dificultant la detecció de la causa de la patologia. Per això, sobre l'any 2011, quan les primeres tecnologies de Seqüenciació massiva van fer-se més accessibles, el laboratori de Neurologia Pediàtrica es va plantejar el seu ús per a incrementar la taxa de diagnòstics.

L'estudi va consistir en la seqüenciació de l'exoma complet (WES) de 12 pacients en un format *singleton* (tan sols el cas índex). Els resultats van ser analitzats a través del filtratge de les variants que afectaven al llistat de gens coneguts en aquell moment, aconseguint resoldre només 2 casos (figura 93). Els pacients diagnosticats van ser el 3 i el 9, i les característiques de les mutacions trobades es detallen a la taula 22.

Davant la taxa d'èxit tan baixa que es va obtenir, es va plantejar posar a punt el panell de gens TruSight One d'Illumina. Amb aquest panell es cobrien 4.813 gens relacionats amb patologies mendelianes (per això també se l'anomena exoma clínic), entre els que es trobaven la majoria de gens associats a NMD descrits en aquell moment. El fet de reduir el nombre de gens seqüenciats proporciona un augment de la cobertura dels seus exons, en comparació amb el WES. D'aquesta manera, es pretenia veure si s'aconseguia augmentar el número de diagnòstics, alhora que es reduïa el temps d'obtenció de resultats i el cost de la tècnica.

Es va realitzar la seqüenciació per TSO de 32 mostres, 6 de les quals ja s'havien seqüenciat per WES. En total, es va aconseguir diagnosticar a 16 dels pacients (Taula 22), i 4 d'ells ja havien estat seqüenciats amb WES i no se n'havia trobat la causa. D'aquesta manera, l'èxit diagnòstic va augmentar d'un 16.6% amb WES a un 50% amb TSO (Figura 93).

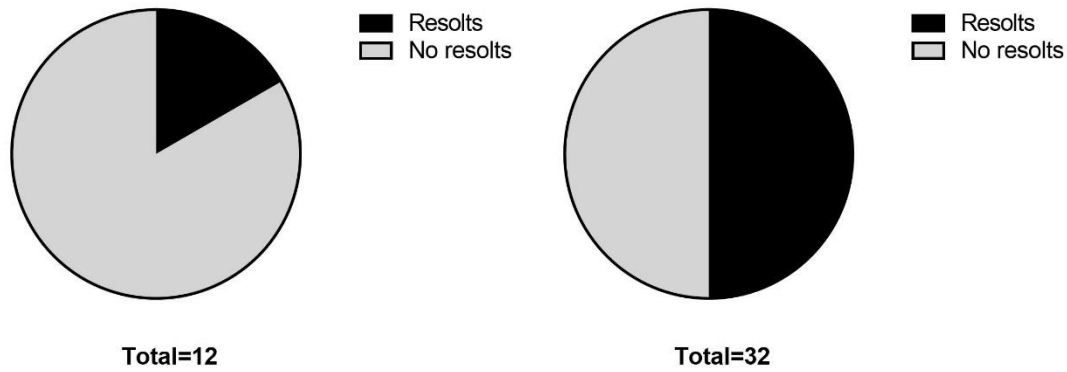


Figura 93: Taxa d'èxit de les diferents tècniques de NGS utilitzades en els pacients amb NMD.

A més, cal remarcar la importància de revisar la cobertura i els canvis que tenen poques lectures (*reads*) abans de descartar els gens candidats dels que se sospita. Aquest pas es duu a terme amb el *software* IGV, que ens permet veure regions mal cobertes, confirmar que la seqüenciació ha estat bona i que les variants que veiem són creïbles. Això és essencial perquè l'anotació del programari del TSO i el seu *pipeline* no detecta com a tals les delecions o insercions que sobrepassen un número determinat de parells de bases. És per això, que dos dels casos van ser detectats mitjançant aquesta eina. El pacient 27, del que se sospitava una alteració al gen del Sarcoglicà Gamma (*SGCG*), es va revisar l'alineament, detectant una manca de lectures a l'exó 7 que suggeria la deleción d'aquest fragment (Figura 94A). Els resultats del pacient 21 també van ser analitzats amb l'IGV, detectant una deleción al principal gen candidat, COL6A1 (Figura 94B).

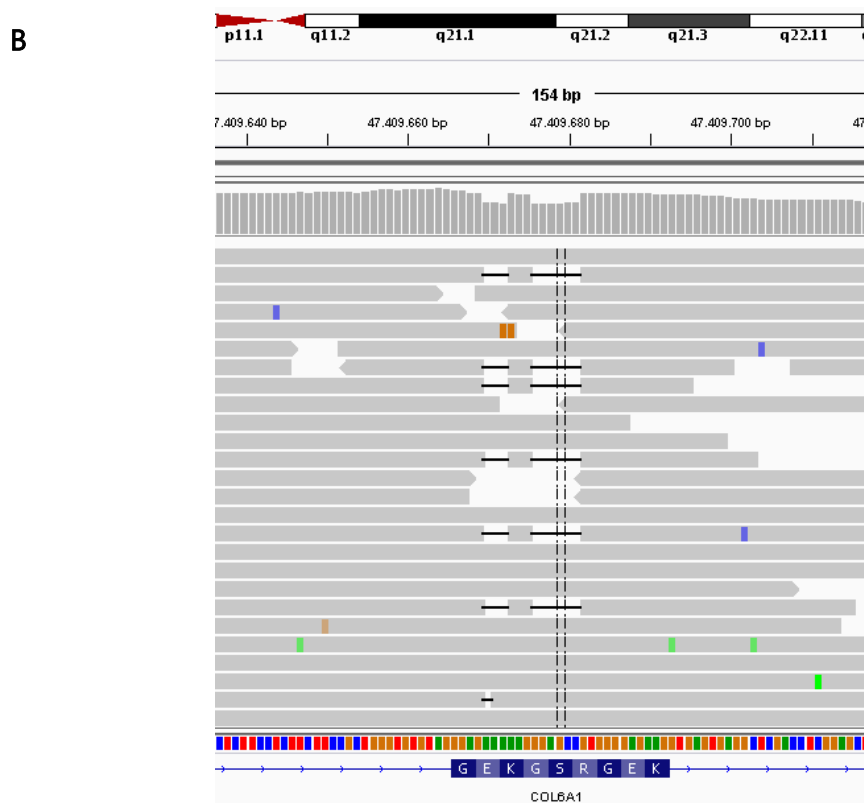
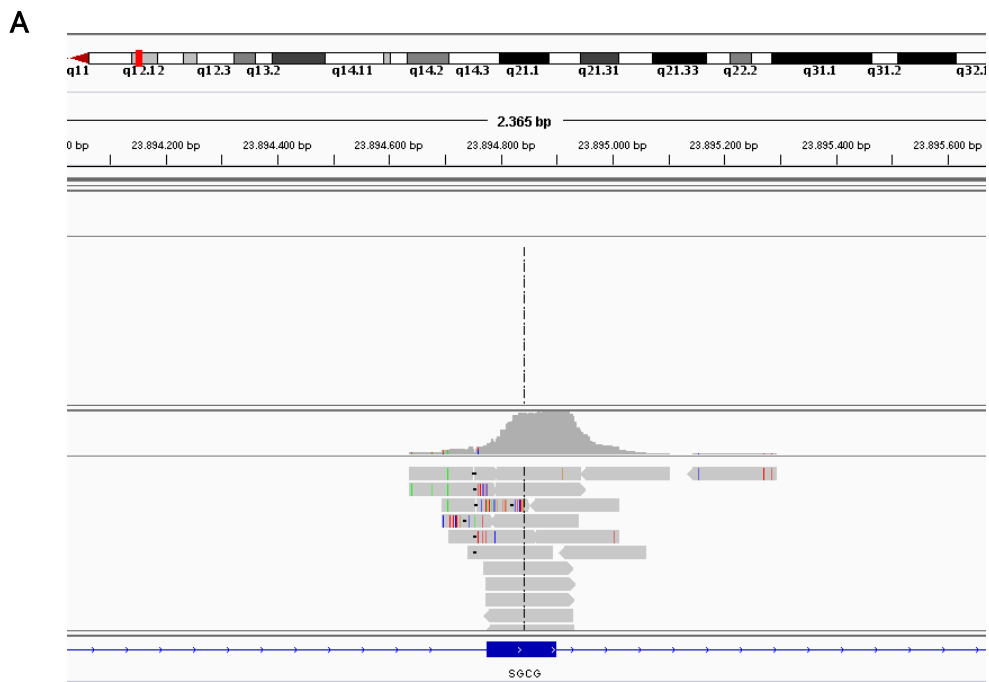


Figura 94: Canvis en gens candidats trobats amb el *software* IGV.

- (A) Imatge corresponent a la cobertura de l'exó 7 del gen SGCG pel pacient 27 (part superior) i el pacient 26, ambdós seqüenciats a la vegada.
- (B) Aquesta imatge correspon a la detecció d'una deleció en el gen candidat COL6A1 pel pacient 21, no present en altres pacients.

A més, en els casos negatius és necessari realitzar nous anàlisis bioinformàtics aplicant *pipelines* diferents, o filtrant les variants pel llistat de gens actualitzat. D'aquesta manera, podem augmentar el percentatge d'èxit en els diagnòstics genètics. És el cas del pacient 5 en els que l'aplicació d'un nou *pipeline* en el marc del projecte PERIS SLT002/16/00174, anomenat "Implementació de la medicina personalitzada basada en la genòmica en malalties minoritàries neurològiques no diagnosticades" va permetre trobar la causa genètica de les seves patologies. Aquest nou *pipeline* consisteix en la combinació dels *softwares* d'anàlisi BWA-MEM, Picard i GATK-HC per a alinear les dades crues de la seqüenciació amb el genoma de referència hg19, cridar les variants i anotar-les. I el cas del pacient 33, que el filtratge pel llistat de gens actualitzat va permetre determinar les variants causants de la seva patologia.

Un últim anàlisi important abans de descartar un gen candidat és revisar detingudament totes les variants trobades en aquest gen, no només les que se'n prediu un impacte elevat en la funcionalitat de la proteïna sinó, fins i tot aquelles que tenen un significat incert. És el cas del pacient 7, afecte de miopatia nemalínica amb una mutació *nonsense* al gen de la nebulina (NEB) ja validada. Al ser una patologia recessiva, la variant única detectada no podia explicar el fenotip. No obstant això, l'anàlisi exhaustiu dels possibles canvis en aquest gen van deixar la possibilitat de que l'altra variant fos una mutació sinònima que podria estar afectant l'*splicing*, ja que els predictors així ho consideraven.

Validació de les variants

Al tractar-se de seqüenciació de casos índexs és imprescindible realitzar una validació, per seqüenciació Sanger, de la variant en el pacient i en els seus progenitors. D'aquesta manera s'eliminaran els falsos positius que s'hagin pogut detectar i també es comprovarà la segregació de la variant en els pares per tal de definir-ne l'herència (Taula 21). Aquest pas va ser realitzat per tots els pacients.

Taula 22: Diagnòstics genètics per NGS

Pacient	Tècnica	Gen	Mutació	Herència	Patogenicitat
1	WES/TSO	DNM2	NM_001005361.2 c.1856C>T; p.Ser619Leu	AD ^A , De novo	S ^D : D, P ^E : D, MTF: DC, ExAC ^G : NA, ¹⁵⁸
3	WES/TSO	TTN	NM_001267550.1 c.95197C>T; p.Gln31733*	AR, Heredada del pare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAC: NP, ND
			NM_001267550.1 c.21068A>C; p.Gln7023Pro	Heredada de la mare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAC: NP, ND
5	WES/R	SEPN1	NM_020451.2 c.988C>T; p.Gln330*	AR, Homozigot, 1 de cada progenitor	S: D, P: NP, MT: DC, ExAC: NA, ND
6	TSO	TTN	NM_001267550.1 c.48253delA; p.Ser16085Valfs*3	AR, Heredada del pare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAC: NP, ND
			Falta trobar la segona mutació	-	
7	TSO/R	NEB	NM_001164507.1 c.2920C>T; p.Arg974*	AR, Heredada de la mare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAc: NA, ³⁹
			NM_001164507.1 c.24579G>A; p.=	Heredada del pare	S: T ^L , P: NP, MT: DC, HSF: afecta l' <i>splicing</i> , ExAc: 0,00003640, ¹⁶⁰
8	TSO	MTM1	NM_000252.2 c.109C>T; p.Arg37*	XL ^C , Heredada de la mare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAc: NA, ¹⁶¹
9	TSO	RYR1	NM_000540.2 c.7323+1G>A	AR, Heredada del pare	HSF: afecta l' <i>splicing</i> , ExAc: 0,000008298, ND
			NM_000540.2 c.13672C>T; p.Arg4558Trp	Heredada de la mare	S: D, P: D, MT: DC, ExAc: 0,000008237, ¹⁶³
11	TSO	RYR1	NM_000540.2 c.6857T>A; p.Leu2286Gln	AR, Homozigot, 1 de cada progenitor	S: D, P: D, MT: DC, ExAc: NA, ¹⁶³

(A) AR = Herència autosòmica recessiva (B) AD = Herència autosòmica dominant (C) XL = Herència lligada al cromosoma X. (D) S = Predictor de patogenicitat Sift. (E) P = Predictor de patogenicitat Polyphen. Per aquests dos, D correspon a una predicció deletèria i N a una neutral. Si l'anotació és NP, significa que no ha estat possible fer la valoració pel tipus de mutació. (F) MT = Predictor de patogenicitat Mutation Taster. La denominació DC significa que prediu que pot ser causant de patologia. (G) ExAc = Base de dades de freqüència poblacional. Quan surt NA significa que no ha estat anotat i no consta a la base de dades. (H) HSF = predictor Human Splicing Finder 3.1. (I) ND o número de referència, ens indica si aquesta variant ha estat descrita i publicada prèviament.



Continuació taula 22.

Pacient	Tècnica	Gen	Mutació	Herència	Patogenicitat	
12	TSO	RYR1	NM_000540.2	c.325C>T; p.Arg109Trp	AR, Heredada de la mare	S: D, P: D, MT: DC, ExAc: 0,0001076, ¹⁶⁵
			NM_000540.2	c.1163C>A; p.Ser388*	Heredada del pare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAc: 0,000008258, ND
13	TSO	MTMR14	NM_001077525.2	c.305_306delAC; p.Thr103Valfs*2	AD, Heredada de la mare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAc: NA, ND
15	TSO	TPM3	NM_152263.2	c.735A>C; p.Arg245Ser	AD, De novo	S: D, P: D, MT: DC, ExAc: NA, ND
16	WES	SEPN1	NM_020451.2	c.1379C>T; p.Ser460Phe	AR ^B , Homozigot, 1 de cada progenitor	S: D, P: D, MT: DC, ExAc: 0,000009974. ND
17	WES/TSO	COL6A2	NM_001849.3	c.954+1G>A	AD o AR, De novo	HSF ^H : afecta l' <i>splicing</i> , ExAc: NA, ND ^I
18	WES/TSO	COL6A1	NM_001848.2	c.1002+1G>A	AD o AR, De novo	HSF: afecta l' <i>splicing</i> , ExAc: NA, ND
19	WES	LMNA	NM_170707.2	c.1621C>A; p.Arg541Cys	AD, De novo	S: D, P: D, MT: DC, ExAc: NA, ¹⁵⁹
20	TSO	LAMA2	NM_000426.3	c.1467+1G>C	AR, Heredada del pare	HSF: afecta l' <i>splicing</i> , ExAc: NA, ND
25	TSO	SGCG	NM_000426.3	c.3038-7G>A	Heredada de la mare	HSF: afecta l' <i>splicing</i> , ExAc: NA, ND

(A) AR = Herència autosòmica recessiva (B) AD = Herència autosòmica dominant (C) XL = Herència lligada al cromosoma X. (D) S = Predictor de patogenicitat Sift. (E) P = Predictor de patogenicitat Polyphen. Per aquests dos, D correspon a una predicció deletèria i N a una neutral. Si l'anotació és NP, significa que no ha estat possible fer la valoració pel tipus de mutació. (F) MT = Predictor de patogenicitat Mutation Taster. La denominació DC significa que preduï que pot ser causant de patologia. (G) ExAc = Base de dades de freqüència poblacional. Quan surt NA significa que no ha estat anotat i no consta a la base de dades. (H) HSF = predictor Human Splicing Finder 3.1. (I) ND o número de referència, ens indica si aquesta variant ha estat descrita i publicada prèviament.

Continuació taula 22.

Pacient	Tècnica	Gen	Mutació	Herència	Patogenicitat
21	TSO	COL6A1	NM_001848.2 c.910_919delinsG	AR o AD, De novo	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAc: NA, ND
22	TSO	COL6A3	NM_004369.3 c.6309+3A>G	AR o AD, De novo	HSF: afecta l' <i>splicing</i> , ExAc: NA, ND
23	TSO	CAPN3	NM_000070.2 c.2361_2362insTTCA; p.Arg788Phefs*14	AR, Homozigosi *, Heredada de la mare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAc: NA, ND
24	TSO	FKRP	NM_001039885.2 c.1219T>C; p.Tyr407His	AR, Homozigosi **, Heredada de la mare	S: D, P: D, MT: DC, ExAc: NA, ND
27	TSO	SGCG	Deleció exó 7 -	En homozigosi	-, ¹⁶⁴
28	TSO	CAPN3	NM_000070.2 c.2361_2362insTTCA; p.Arg788Phefs*14	AR, Heredada de la mare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAc: NA, ND
			NM_000070.2 c.1992+1G>T	Heredada del pare	HSF: afecta l' <i>splicing</i> , ExAc: NA, ¹⁶⁶
30	TSO	DOK7	NM_173660.4 c.190G>A; p.Gly64Arg	AR, Heredada del pare	S: D, P: D, MT: DC, ExAc: NA, ¹⁶²
			NM_173660.4 c.1120_1121insGCCT; p.Ala378Serfs*30	Heredada de la mare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAc: 0,0007488, ND
33	TSO/R	COG6	NM_020751 c.215G>C; p.Arg72Pro	AR, Heredada del pare	S: D, P: D, MT: DC, ExAc: NA, ND
			NM_020751 c.1941_1947delATCGCCG; p.Pro649fs*	Heredada de la mare	S: NP, P: NP, MT: DC, ExAc: NA, ND

(A) AR = Herència autosòmica recessiva (B) AD = Herència autosòmica dominant (C) XL = Herència lligada al cromosoma X. (D) S = Predictor de patogenicitat Sift. (E) P = Predictor de patogenicitat Polyphen. Per aquests dos, D correspon a una predicció deletèria i N a una neutral. Si l'anotació és NP, significa que no ha estat possible fer la valoració pel tipus de mutació. (F) MT = Predictor de patogenicitat Mutation Taster. La denominació DC significa que prediu que pot ser causant de patologia. (G) ExAc = Base de dades de freqüència poblacional. Quan surt NA significa que no ha estat anotat i no consta a la base de dades. (H) HSF = predictor Human Splicing Finder 3.1. (I) ND o número de referència, ens indica si aquesta variant ha estat descrita i publicada prèviament.

La informació de les variants, així com les validacions, va permetre concloure la majoria de diagnòstics. Malgrat això, tres dels casos (pacients 10, 13 i 31) van ser classificats com a casos dubtosos, ja sigui pel tipus de gen o pel tipus d'herència:

- Pacient 3: presenta dues mutacions al gen de la TTN, una d'elles es prediu com a altament patogènica, ja que genera un codó STOP prematur. L'altre és una *missense* potencialment patogènica.
- Pacient 6: se li va trobar una deleció al gen de la TTN causant d'un *frameshift* i a més, un gran nombre de variants de significat incert en aquest mateix gen. Al ser un gen d'herència recessiva, cal determinar si hi ha una segona mutació que pugui ser causant, sempre i quant quadri amb el fenotip.
- Pacient 13: es va trobar una deleció de dos parells de bases al gen MTMR14 resultant en un *frameshift*. Aquesta és heretada de la mare sana, cosa que posa en dubte la validesa de la variant degut a la herència dominant que caracteritza aquest gen.

Anàlisi funcional de variants amb significat incert

En alguns casos, per donar validesa a determinades mutacions, conegudes com de significat incert (VUS) va fer falta realitzar anàlisis complementaris, com ara els estudis de ARNm. Aquesta tècnica va ser utilitzada per a validar l'impacte sobre el procés d'*splicing* de les variants identificades en els pacients 17, 22 i 28. També va ser útil per a estudiar l'efecte real de la mutació sinònima en el gen de la Nebulina detectada al cas 7. Per a dur a terme aquest procés, es va extreure l'ARNm total de la biòpsia muscular de cada pacient, es va retrotranscriure, amplificar i seqüenciar la regió d'interès. En alguns casos, en els que la quantitat de biòpsia muscular no era suficient, no es va poder realitzar aquest estudi. Els resultats es recullen a la taula 23.

Taula 23: Anàlisi de l'impacte funcional de les variants de significat incert (VUS)

Pacient	Gen	Mutació	Efecte en la pauta de lectura
7	NEB	NM_001164507.1 c.24579G>A; p.=	Activació d'un nou <i>donor site</i> , delecionant un fragment de l'exó GAGCT
17	COL6A2	NM_001849.3 c.954+1G>A	Deleció de l'exó 9
22	COL6A3	NM_004369.3 c.6309+3A>G	Deleció de l'exó 15
28	CAPN3	NM_000070.2 c.1992+1G>T	Deleció de l'exó 17

Relació entre diagnòstic clínic i diagnòstic genètic

Un aspecte essencial per a determinar quins factors poden influir en la taxa d'èxit de diagnòstic genètic va ser establir una relació entre les dades clíniques de les que disposàvem (informes de electromiografia, biòpsia muscular, ressonància magnètica, observacions del fenotip per part del clínic especialista...) i les variants causals, en cas de que s'haguessin detectat.

Sembla existir una relació que ens marca que com més dirigit sigui el diagnòstic clínic, fins i tot, que sigui capaç de reduir-nos el llistat de gens a uns pocs, més probabilitat de trobar la causa genètica hi ha. Extraient els tres casos dubtosos que es van presentar, la figura 95 demostra aquesta conclusió.

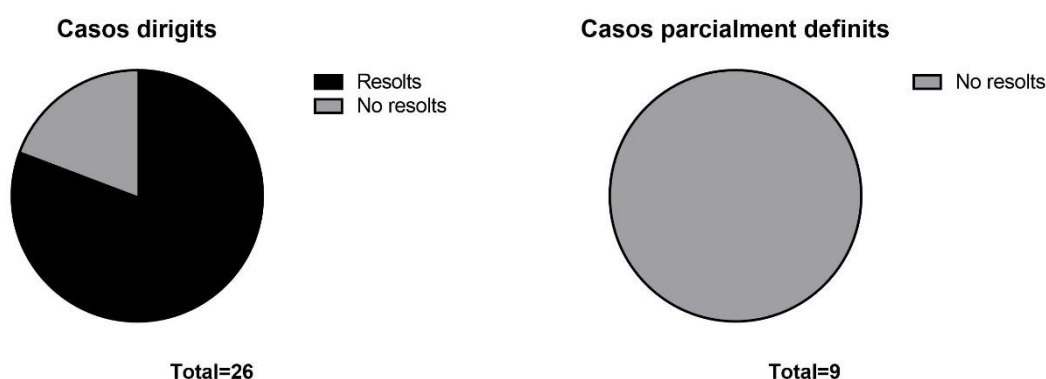
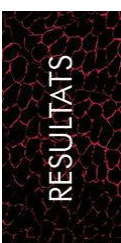


Figura 95: Diferències d'èxit entre un diagnòstic clínic clar que dirigeix el diagnòstic molecular i un diagnòstic parcialment definit.

En el primer cas es van resoldre 21 dels 26 estudiats i en el segon, no es va aconseguir diagnosticar cap dels 9 casos estudiats. Els tres que considerem dubtosos no s'han tingut en compte en aquest anàlisi.



DISCUSSIÓ

Discussió del tractament amb E2

Des de fa anys es coneixen els efectes beneficiosos del estrògens en el rendiment i el metabolisme muscular^{20,21,23,33,38} i també que en el gènere masculí, l'estradiol se sintetitza a partir de la testosterona a nivell perifèric (a múscul esquelètic, entre d'altres teixits), mitjançant l'acció de l'enzim p450 Aromatasa, en diverses espècies animals inclosa la humana. Tanmateix, sembla ser que els nivells d'estradiol en els mascles no serien suficients per a exercir les accions protectores que desenvolupen en les femelles.¹⁶⁷ Però tractar els nens afectes de DMD amb hormones sexuals a edats tan precoces no és possible, degut als grans efectes adversos que poden tenir aquests tipus de tractaments a curt i llarg termini.

Existeix una evident necessitat de trobar una teràpia que permeti millorar la qualitat de vida dels pacients amb DMD. Pel que això, juntament amb la hipòtesi del nostre grup de que els estrògens poden estar modulant alguns aspectes beneficiosos per la patologia, va dur al disseny d'un tractament amb 17 β -Estradiol (E2) en ratolins *mdx*, model murí deficient en distrofina. Aquest estudi ens havia de permetre trobar dianes terapèutiques a partir de les quals avançar en el coneixement de la fisiopatologia de la Distròfia Muscular de Duchenne.

És efectiu el tractament?

Previ a veure els efectes de l'E2 sobre el múscul esquelètic, es va voler assegurar que aquesta via de tractament, la inserció d'un pellet que conté el compost, era apte i aconseguia incrementar els nivells d'E2 en sang en els animals tractats. Com s'ha pogut veure a resultats, el pellet es dissolia en el greix i es distribuïa sistèmicament, sense afectar la viabilitat, l'evolució i l'estat dels animals durant el temps de tractament.

Els efectes de les hormones sexuals en la regeneració muscular han estat àmpliament descrits. Ha estat reportat que l'E2 pot atenuar els marcadors de dany muscular en sang després d'induir el dany muscular, com en el exercici excèntric (córrer en una cinta, per exemple). A més, està descrit que aquest efecte no és instantani i que es manté en el temps, com s'ha pogut veure en rates ovariectomitzades que havien assolit la maduresa prèviament a la intervenció.²⁹ Durant el nostre treball, s'ha pogut comprovar que aquesta atenuació del dany es produeix també en els nostres animals, tan en els nivells basals de

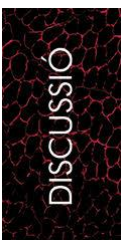
CKs (en els dels primers experiments), com en els nivells dels que van realitzar exercici. També s'ha descrit que amb l'exposició als E2 es produeix una reducció de la infiltració dels macròfags pro-inflamatoris, que les femelles presenten una invasió menor post-dany comparat amb els mascles i que a més, es produeix un retard de l'aparició d'aquestes cèl·lules al teixit.^{25,26,32} L'estudi del múscul quàdriceps per mitjà de seccions transversals i de la tinció d'Hematoxilina-Eosina, no ha pogut demostrar cap d'aquests canvis en els nostres animals. Si bé és cert que, a l'estar realitzant un tractament d'un mes de durada, pot ser que no s'arribi a veure les diferències en la infiltració que es produeixen en un instant concret del procés de necrosi-inflamació, per estar-ho visualitzant en moments previs o posteriors. També és molt probable que no aconseguim veure aquests canvis perquè la tinció d'H-E és molt genèrica i ens ajuda a veure l'estat general del múscul. En les altres característiques histològiques pròpies del teixit danyat i en regeneració tampoc s'han pogut veure grans diferències entre les condicions.

Què està canviant l'E2?

Són molt coneguts els efectes de l'E2 en el múscul però no se sap ben bé per quins mecanismes ho fa. Tot i això, existeixen tres teories predominants³³:

- 1) Per la seva estructura similar a altres antioxidants, com la Vitamina E, es pensa que té una elevada capacitat antioxidant i pot tenir l'habilitat de degradar radicals lliures i estimular l'expressió d'enzims antioxidants, limitant així el dany oxidatiu.
- 2) Per la seva semblança amb el colesterol, pot ser que tingui habilitat per intercalarse entre els fosfolípids de la membrana, estabilitzant-la.
- 3) Per la presència a múscul dels seus dos receptors: ER α i ER β . A través d'ells, el estrògens poden regular molts gens i dianes moleculars *downstream*.

Per tal de veure els efectes dels estrògens en els gens *downstream*, s'han realitzat els estudis d'expressió per microarrays. Com s'ha vist en els resultats, l'E2 es troba modulant les vies de senyalització implicades en la regulació del sistema immune, molt probablement també en la inflamació, i en la proliferació i els processos de desenvolupament.



Quins gens, interessants funcionalment, està modificant?

De l'anàlisi realitzat per mitjà dels *microarrays*, es van seleccionar uns gens per validar la seva expressió. Aquests gens van ser seleccionats pel seu interès funcional i per trobar-se sobreexpressats en els animals tractats amb E2.

El primer gen seleccionat, va ser Ngfr (de l'anglès, *Nerve Growth Factor Receptor*) o p75^{NTR}, del que es parlarà més endavant.

Un altre gen va ser, Drp2 (de l'anglès, *Dystrophin-related protein 2*), ja que es tracta d'un gen de la família de la distrofina que juntament amb la isoforma Dp116 i la G-utrofina retenen l'habilitat del domini C-terminal de Dmd i utrofina (Drp1) per associar-se a distroglicans, distrobrevines i varis membres de la família de la sintrofina per formar el complex DPC.¹⁵⁵ L'expressió de Drp2, però, es redueix sobretot a diferents parts del cervell com el bulb olfactori, el còrtex, l'estriat i la medulla espinal, tot i que, també s'ha vist expressió a l'ull, l'ovari, l'epidídim i els testicles però no a múscul esquelètic o cardíac. Es creu que pot tenir un rol anàleg a distrofina i utrofina a sistema nerviós central de vertebrats.¹⁶⁸ De fet, mutacions en aquest gen estan associades a una forma moderada de Charcot-Marie-Tooth. La seva funció a múscul murí encara està per determinar però en un estudi en múscul cardíac boví s'ha descrit que s'associa al sarcoglicà-gamma (SGCG)¹⁶⁹ i que en múscul del peix de la família dels torpedínids, *Torpedo Marmorata*, la proteïna Drp2 s'expressa sobretot en les fibres lentes, les de tipus I. Pel que en futurs estudis es podria comprovar si aquesta expressió també es produeix i la seva localització en el múscul de ratolí i si el seu augment en el tractament que s'ha realitzat pot deure's a un viratge de la composició dels músculs cap a un augment de les de tipus I.

Un gen més sobreexpressat va ser WISP2/CCN5 (de l'anglès, *Wnt-1-induced signaling protein-2*). En el moment dels *microarrays* es coneixia molt poc de la funcionalitat d'aquest gen però ara està descrit que forma part de la família de les CCNs, gens implicats directament en la fibrosi, ja sigui inhibint o promovent-la. Aquest és el cas de Ctgf, membre conegut i profibròtic d'aquesta família.¹⁵⁴

Aquests gens tenen un paper en la regulació de les cèl·lules precursors mesenquimals, en les que Wisp2 frena la diferenciació adipogènica i promou la seva proliferació. A més, sembla tenir un rol antifibròtic, un paper important durant el desenvolupament embrionari, la cicatrització i reparació de lesions, l'angiogènesi. També podria estar

inhibint l'acció de TGF- β (de l'anglès, *Transforming Growth Factor- β*)¹⁷⁰, promotor principal de la fibrosi a múscul.¹⁷¹ Es coneix que Wisp2 s'indueix en resposta als estrògens i més concretament per acció del receptor d'estrògens α (ER α) i que és necessari per la inducció de la proliferació promoguda per IGF1 en tumors de mama.¹⁷² IGF-1 a múscul activa la via PI3K/Akt que com ja hem dit promou la hipertròfia, la supervivència i reverteix l'atrofia muscular per desús o falta d'innervació.¹⁷³ Veient les implicacions de Wisp2 en la regulació de la miogènesi, resultaria un bon candidat per a futurs estudis.

L'últim seleccionat va ser, MMP-9 (de l'anglès, *Matrix Metalloprotease 9*). Es tracta d'una proteïna de la família de les metal·loproteases, que s'encarreguen de regular la formació, remodelació i degradació de la matriu extracel·lular (ECM)¹⁵³, i aquesta és crucial pel manteniment de l'homeòstasi i la integritat funcional de les fibres musculars¹⁷⁴. Està descrit que a múscul del model caní CXMD, MMP-9 s'expressa en fibres degenerants rodejades de cèl·lules inflamatòries, pel que se li ha atribuït un rol en la inflamació durant el procés de degeneració.¹⁷⁵ A més, s'ha vist que els nivells de MMP-9 en sèrum estan augmentats en pacients de DMD i que aquest incrementa amb l'edat.¹⁷⁶ Un estudi més exhaustiu d'aquesta proteïna en un doble knockout mdx/Mmp9^{-/-} ha demostrat que és essencial un balanç dels nivells de MMP-9 per la correcta evolució de la patologia. La deleció d'aquest gen en estadis prematurs de la patologia produeix una disminució de la necrosi i de la infiltració de neutròfils, a la vegada que un augment de la regeneració muscular. Però en estadis més tardans, s'observa una deficiència del creixement muscular per alteració de l'expressió dels factors miogènics i un augment del teixit fibroadipós.¹⁷⁷ A més, estan descrits efectes contraposats ja que s'ha vist que en el ratolí mdx, pot generar hipertròfia mitjançant la fosforilació d'Akt¹⁷⁸ però també que la seva inhibició millora la regeneració i atenua el fenotip.¹⁷⁹ Pel que incidir en la regulació d'aquesta proteïna amb rol dual podria resultar beneficiós per la DMD, igual que entendre quin pot ser l'efecte del seu augment en animals tractats E2, tal i com observem en el nostre cas..

Què s'obté de l'aplicació dels tests funcionals?

Per tal d'obtenir més dades dels efectes de l'E2, el grup es va plantejar l'aplicació d'una rutina de tests funcionals que ens avaluar el seu estat físic. Es van emprar els dos tests de suspensió protocol·litzats per Treat-NMD. Es tracta d'exercicis que mesclen

contraccions excèntriques i concèntriques, que com s'ha pogut comprovar sembla que també produeixen un agreujament del fenotip: s'obtenen nivells de CKs més alts i trets histològics deteriorats. Amb aquests tests s'ha comprovat que l'E2 produeix una millora de les condicions físiques de l'animal tant en força (test de suspensió per quatre extremitats) com sobretot, en coordinació (test de suspensió per dues extremitats). Aquesta millora es fa més evident durant el pic de necrosi-regeneració, a les 5 setmanes. Com s'ha comprovat, malgrat haver-hi un increment dels nivells de CKs es mantenen les diferències entre condicions. A més, hi ha un empitjorament de les característiques histològiques però d'igual manera en tot els animals, siguin tractats amb E2 o placebo. Tot i això, destaca que aplicar els tests funcionals en el nostre tractament no produeix increment dels nivells en sèrum en els animals amb pellet d'E2 comparat amb els que no havien realitzat exercici. Aquesta observació invalida la teoria de que l'exercici augmenta els nivells circulants d'hormones sexuals descrita prèviament^{27,28}, però no que l'exercici potencii l'acció d'aquestes hormones.

Anàlisi histològic

En aquest treball s'ha realitzat un anàlisi dels trets histològics característics de la patologia per dèficit de distrofina, amb el que no s'ha aconseguit veure diferències entre placebo i E2, excepte entre els que no van fer exercici i els que sí, com s'acaba de comentar.

Aquest estudi ha estat realitzat sobre el múscul quàdriceps, que tot i que, està descrit que és difícil d'interpretar per estar compost per varis músculs, s'ha utilitzat per dos motius principals:

- Està descrit que en el ratolí *mdx*, els músculs presenten diferents trets fisiopatològics. És a dir, els músculs quàdriceps i GMG presenten més necrosi i inflamació i molt poca fibrosi. En canvi, el tibial anterior, el sòleus i el diafragma no presenten gairebé necrosi ni inflamació però sí fibrosi.¹⁸⁰ Com que la fibrosi només és visible a partir dels dos anys de vida del ratolí distròfic, resultava més interessant veure les diferències en els altres dos trets
- A més, està descrit que el quàdriceps presenta un percentatge de fibres tipus I que va del 0 al 45%, en canvi el GMG, del 1 al 8%. Utilitzant el quàdriceps permetria veure l'efecte de l'E2 sobre els dos tipus de fibres. De fet, es coneix que

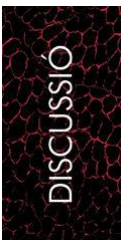
el diafragma dels ratolins *mdx* joves presenten un canvi de fibres a les de tipus I per tal de preservar al funció contràctil i promoure una millor supervivència per la disminució dels requeriments energètics.¹⁸¹

Tot i això, caldria fer tractaments a més llarg termini per tal de veure diferències a nivell histològic.

L'E2 modifica l'evolució de la patologia?

En l'intent de veure si l'E2 podria estar modulant altres trets fisiopatològics, es va analitzar l'acumulació de calci intracel·lular i l'expressió de gens relacionats amb l'homeòstasi del calci. Tot i veure una reducció dels dipòsits de calci mitjançant la tinció d'Alizarin Red S, no hi ha cap canvi significatiu en l'expressió dels gens relacionats amb el reticle sarcoplasmàtic. Si s'observa que el tipus de fibra predominant al múscul i l'exercici són factors modificadors d'aquest tret. Es podria plantejar estudiar l'expressió d'altres gens relacionats amb l'homeòstasi del calci, com aquells que es troben a la membrana sarcoplasmàtica però sembla més aviat, que l'E2 es troba actuant per altres mecanismes en aquest aspecte. Pot ser que l'E2 es trobi estabilitzant la membrana i evitant el flux entrant de calci.

Vist que l'E2 altera gens relacionats directa o indirectament amb la fibrosi es va plantejar si tenia algun impacte en la seva aparició i/o evolució. Per això es va realitzar la tinció de Tricròmic de Masson, on no s'han pogut apreciar canvis entre les condicions. El més segur és que sigui degut a que els animals arriben a les 8 setmanes d'edat i la fibrosi en el ratolí *mdx* només és visible, com ja s'ha dit, en el diafragma a l'edat adulta, mentre que els músculs més accessibles, com als de les extremitats, comença a aparèixer als dos anys i no assoleix mai la severitat que s'observa en els humans⁶⁵. Potser amb un tractament a molt llarg termini veuríem un major impacte en la fibrosi a nivell histològic i utilitzant la tècnica de la immunofluorescència específica, aconseguirem veure possibles diferències de forma més evident.



Per quins mecanismes està actuant E2?

El principal punt d'interès al dilucidar per quin mecanisme podria estar actuant l'E2 va ser determinar a través de quin receptor feia les seves funcions, ja que està descrit que a múscul s'expressen tots dos receptors, ER α i ER β . Sobretot es descriu una elevada expressió d'ER α , que es troba a cèl·lules satèl·lit, miofibres i cèl·lules endotelials^{23,182} i que resulta sensible als nivells circulants d'E2.

De forma general, els receptors d'estrògens tenen un rol important en l'activació i la proliferació de les cèl·lules satèl·lit, tant quiescents com activades, i la dels mioblasts en la regeneració i el creixement^{183,184}. Es creu que actuen estimulants la via PI3K/Akt, la diferenciació per la sobreexpressió de miogenina i MHC, l'activitat de MyoD i la prevenció de l'apoptosi.¹⁸² Però de forma més específica, es va descriure que ER α promou senyals ràpides de proliferació i supervivència i que ER β , ho fa amb senyals d'apoptosi i diferenciació cel·lular.³⁷ És més, en proves en *knockout* dels dos receptors es va veure que la deleció d'ER α produeix una pèrdua de la massa i les propietats contràctils del múscul, a la vegada que es perden els efectes de proliferació sobre les cèl·lules satèl·lit quiescents. El mateix es veu en els ratolins amb pèrdua global d'aromatasa (enzim que converteix la testosterona a estrògens en el múscul esquelètic) però no en el ratolí *knockout* per ER β .¹⁸⁵ Tot i això encara existeix alguna controvèrsia perquè també es va descriure que ER β està implicat en la regulació del creixement i la regeneració del múscul esquelètic.¹⁸⁶

En el tractament realitzat en aquest treball s'ha vist un increment del Receptor d'estrògens alfa (ER α) en els animals tractats amb E2 que van realitzar exercici. Això indica que els tests funcionals aconsegueixen potenciar els seus efectes com s'havia descrit però que podria ser que en el cas dels animals que no van fer els tests funcionals, l'acció de l'E2 vagi per un altre mecanisme.

Com ja s'ha comentat diverses vegades al llarg d'aquest treball, les accions d'E2 semblen estar molt relacionades amb la via de senyalització IGF-1/PI3K/Akt.

Com ja hem dit més amunt en la discussió, l'IGF-1 (de l'anglès, *Insulin Growth Factor-1*) és un modulador del creixement i la regeneració en el múscul esquelètic i en molts altres teixits. Activa la proliferació de mioblasts a través de la via de la PI3K (de l'anglès *Phosphatidylinositol 3-kinase*) promovent la hipertrofia muscular activant la síntesi proteica i la supervivència cel·lular. A la figura 96 es poden veure les implicacions de la via d'IGF-1/PI3K/Akt.

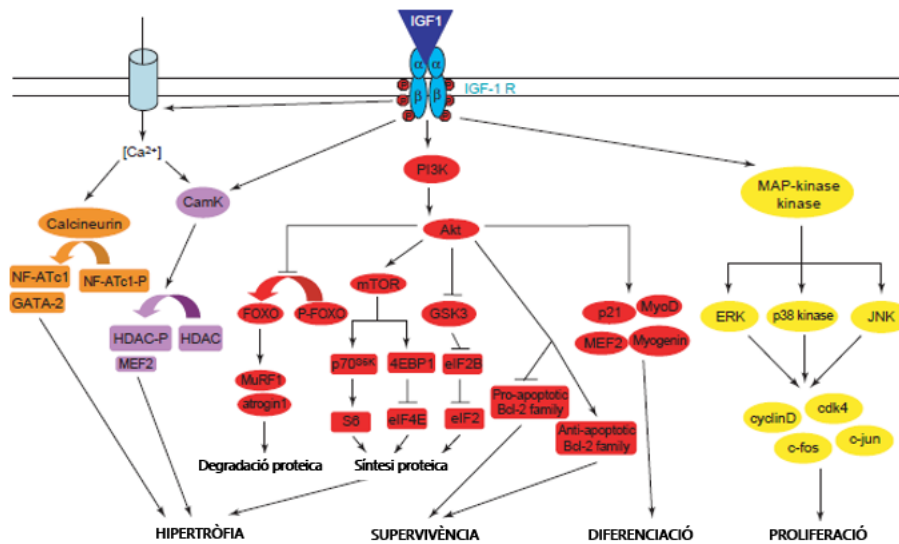


Figura 96: Vies que pot induir IGF-1.

S'observa la via PI3K/Akt i la seva implicació en la supervivència. Imatge extreta i adaptada de Mourkioti, F. et. al. 2005.

Existeixen 4 isoformes d'IGF-1, de les quals la forma autocrina MGF (o mIGF) s'activa ràpidament en el múscul danyat i amb l'exercici, fet que demostra el seu rol en la regeneració. És un factor de supervivència que ajuda a mantenir la integritat del múscul, al control de la inflamació amb el dany i retardar la degeneració muscular.¹⁸⁷ De fet, està comprovat que en un ratolí *mdx* transgènic, sobreexpressant IGF-1 es produeix un augment de la massa muscular i una reducció de les àrees de necrosi i de la fibrosi. Això suggereix que l'mIGF té un efecte en la supervivència prolongant la vida de les fibres madures.¹⁸⁸

En l'intent de confirmar si IGF-1 estava implicat en la via de senyalització d'E2 es va comprovar la seva expressió per PCR a temps real (figura 97), observant una lleugera disminució de l'expressió en totes les condicions. Aquest fet estaria indicant que IGF-1 no està implicat en la via de senyalització i que a més, l'E2 estaria regulant negativament la seva expressió. Aquest tret ja ha estat descrit prèviament, indicant que l'activació i

proliferació de les cèl·lules satèl·lit pels estrògens es produeix a través de la via PI3K/Akt però no per IGF-1.¹⁸⁹

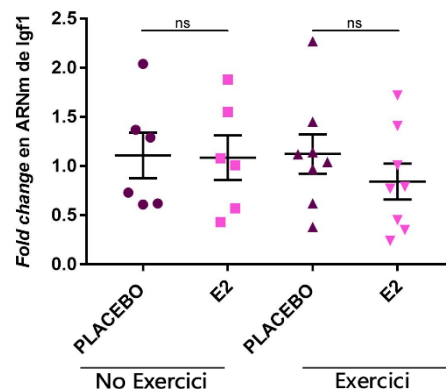


Figura 97: Valors de canvi d'expressió per IGF-1.

(A) Expressió de p75^{NTR} en les diferents condicions. Els valors de la mitjana observats pels animals que no van realitzar exercici són de 1,14±0,339 pels placebo i de 0,7725±0,1605, pels E2. En canvi, pels animals que si que van realitzar, són de 1,203±0,39 pels placebo i de 0,885±0,2219 pels E2.

A més, se sap que IGF-1 promou la hipertròfia en el ratolí, d'igual manera que ho fa l'activació i l'augment d'un gen *downstream* de la via, Akt (o PKB de l'anglès, *Protein Kinase B*). De fet, l'activació d'aquesta proteïna de forma aguda (durant 2-3 setmanes) és suficient per induir que es dobli la mida de l'àrea transversal de les fibres.¹⁹⁰ En els resultats obtinguts de les vies modificades per l'E2, es pot comprovar que una d'elles correspon a la via d'Akt, com es pot veure en la taula 19 de resultats. La sobreexpressió i activació mitjançant la fosforilació d'Akt podria explicar l'augment de l'àrea de les fibres en els individus tractats amb E2, tal com s'observa en els comptatges de la immunofluorescència per p75^{NTR}.

PI3K promou l'activació per fosforilació d'Akt, que és una de les principals proteïnes del senyal ascendent de la família de Bcl-2, i l'Akt fosforilat (p-Akt) sembla promoure la via de supervivència. La membrana de les mitocòndries són el lloc principal d'acció per a la família de proteïnes que regula la apoptosi, exemplificada per la família Bcl-2, com ara Bcl-2 i Bax.

La susceptibilitat a l'apoptosi normalment es regeix per faccions oposades de la família Bcl-2, incloent-hi membres de la família pro-apoptòtics i anti-apoptòtics. Aquests poden homodimeritzar o heterodimeritzar entre si, interactuant i inactivant-se, de manera que influeixen en el flux de Citocrom C de l'interior de les mitocòndries. Quan el citocrom C és alliberat al citosol, activa les caspases (9 i 3) conduint a la fragmentació del DNA i a

l'apoptosi.

Curiosament, s'ha descrit que l'exercici promou l'acció de la via IGF-1/PI3K/Akt en la supervivència cel·lular augmentant també l'expressió dels membres anti-apoptòtics de la família Bcl-2.¹⁹¹

És per això que es va plantejar veure si el que estava produint el tractament amb E2 era la promoció de la supervivència de les fibres musculars mitjançant la modulació d'aquestes vies. La quantificació de l'expressió de Bcl-2 i Bax revela que efectivament, s'està potenciant la supervivència cel·lular, observable sobretot per la disminució de la ratio Bax/Bcl-2. Aquesta ratio ens mostra la susceptibilitat de les cèl·lules a patir apoptosi davant dels estímuls, que en el nostre cas demostra que els ratolins tractats amb E2 aguanten millor els estímuls i es produeix menys mort en el teixit. Curiosament, l'exercici no aconsegueix els mateixos efectes en els placebo que el que s'observa en els E2, indicant que l'acció de les hormones sobre la via és més accentuada i que com ja s'havia descrit, l'exercici potencia l'efecte dels estrògens.

A més, s'ha descrit que Akt modula l'expressió de marcadors de diferenciació muscular terminal com, MyoD, MEF2 (de l'anglès, *Myocyte enhancer factor-2*) i la miogenina. Aquesta és un factor de transcripció essencial per al desenvolupament del múscul esquelètic funcional en els ratolins. És necessària per a la diferenciació adequada de la majoria de cèl·lules precursors miogèniques durant el procés de miogènesi. Quan s'afecta el gen de la miogenina, s'observen defectes greus del múscul esquelètic.¹⁹² En aquest treball s'ha pogut veure un augment de l'expressió d'aquest gen en els animals tractats amb E2 indicant que s'està promovent la proliferació i diferenciació miogènica, segurament per acció de la via d'Akt.

En canvi, la miostatina és membre de la família del TGF β , i és un potent regulador negatiu del creixement del múscul esquelètic, conservat en moltes espècies, des de rosegadors fins a humans. La inactivació de la miostatina pot induir la hipertròfia del múscul esquelètic, mentre que la seva sobreexpressió o administració sistèmica ocasiona atròfia muscular.¹⁹³ A més, la seva reducció atenua la severitat de la distrofinopatia del ratolí *mdx*.¹⁹⁴ Aquest gen té una acció addicional que es relaciona amb la inhibició de l'activació d'Akt en mioblasts i miotubs, efecte revertit per l'aplicació d'IGF-1.¹⁹⁰ En els experiments realitzats en aquesta tesi no s'ha pogut concloure que existeixin diferències en l'expressió de la miostatina, encara que es pot observar una lleugera disminució en els animals

tractats amb E2 que no havien realitzar cap test funcional.

Com s'ha descrit prèviament, els estrògens actuen directament sobre el *pool* de cèl·lules satèl·lit, augmentant el nombre de cèl·lules: les quiescents (Pax7⁺) i les activades (Pax7⁺/MyoD⁺).³⁵ Després de l'activació de cèl·lules de satèl·lit, s'indueix MyoD i la relació Pax7/MyoD juga un paper crític en la determinació del destí cel·lular. A baixes proporcions Pax7/MyoD, les cèl·lules es comencen a diferenciar i indueixen l'expressió de miogenina, provocant una ràpida pèrdua de Pax7. Les proporcions intermèdies de Pax7/MyoD eviten la inducció de la miogenina i poden afavorir la proliferació i supervivència de les cèl·lules satèl·lit activades. A més, una petita població de progenitors musculars adquireix o manté una major proporció de Pax7/MyoD, causant una pèrdua de l'expressió de MyoD i fent que la cèl·lula passi a renovar el *pool* de quiescents.

Els nivells d'expressió d'aquests marcadors de cèl·lules satèl·lit ens indiquen com es troben els *pools* i si el nostre tractament està promovent algun canvi. En els resultats exposats s'ha vist que l'E2 està actuant sobre les cèl·lules quiescents, degut a l'elevada sobreexpressió de Pax7⁺ i també en el de cèl·lules activades, incrementant molt la seva expressió. Això ens indicaria que per algun mecanisme els estrògens són capaços d'activar i promoure la proliferació de les cèl·lules satèl·lit.

Aquest efecte és molt interessant ja que en els ratolins *mdx* igual que en els pacients DMD es produeix una degeneració muscular que es postula pot ser causada per un defecte en les cèl·lules satèl·lit. Existeixen tres teories que explicarien la degeneració¹⁷:

1. Els cicles repetitius de replicació porten a la senescència de les cèl·lules satèl·lit, degut a l'escurçament dels telòmers. Fenomen observat en pacients amb DMD i LGMD.
2. La diferenciació podria no se adequada. Pot ser que la mutació primària causant de la patologia, afecti la funcionalitat de les cèl·lules satèl·lit, reduint el seu numero i causant una senescència prematura.
3. El pool de cèl·lules satèl·lit pot ser que hagi perdut la seva capacitat regenerativa degut a l'ambient advers que l'envolta.

Sigui quina sigui la teoria real, (fins i tot pot ser que sigui una combinació de les tres)

augmentar la quantitat de cèl·lules satèl·lit permetria arribar a la senescència més tard, i per tant, aplaçar la degeneració muscular en el temps.

El fenotip més lleu del ratolí *mdx*

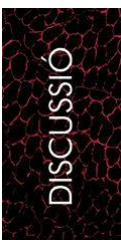
Com ja s'ha comentat durant la introducció, el ratolí *mdx* presenta un fenotip més lleu que els pacients amb DMD. S'ha descrit que l'estabilitat del múscul en el ratolí *mdx* és atribuïble a un increment de l'expressió de la utrofina com a compensació a la falta de distrofina.^{60,76,77} Un punt interessant d'aquest treball ha estat veure si es produïen canvis en l'expressió d'aquesta proteïna per acció de l'E2 i s'ha confirmat que es produeix una tendència a l'augment de l'expressió de la Utrn en els animals tractats que no havien realitzar exercici. Però que aquests canvis es perden amb l'exercici, segurament degut a la inducció de la disrupció de membrana a causa dels tests funcionals i els continus cicles de necrosi-regeneració..

L'augment de la Utrn en les nostres animals pot dur a una major estabilitat de la membrana sarcoplasmàtica, reduint l'influx de calci i la mort cel·lular.

Importància de p75^{NTR}

En el múscul esquelètic s'ha demostrat que p75^{NTR} s'expressa en cèl·lules satèl·lit Pax7⁺¹⁹⁵, en mioblasts i miotubs primaris d'humans¹⁹⁶, així com en fibres regenerants¹⁹⁷. Se sap sobretot la seva funció a sistema nerviós central, on té implicacions en múltiples processos de mort cel·lular, supervivència i elongació axonal¹⁹⁸⁻²⁰². Estudis més recents han denotat que la deleció gènica de p75^{NTR} augmenta la resposta inflamatòria i bloqueja la resposta a la recuperació mediada per les cèl·lules satèl·lit en els membres posteriors d'un model d'isquèmia.²⁰³ A més de ser un marcador de cèl·lula precursora de múscul esquelètic amb un elevat potencial, actua positivament regulant la miogènesi i la maduració de les miofibres²⁰⁴, i el bloqueig de la senyalització de p75^{NTR} *in vivo* en un model de ratolí dificulta la regeneració muscular.²⁰² A més de tot això, ja està descrita una sobreexpressió d'aquest gen en el cervell del ratolí *mdx*.²⁰⁵

Totes aquestes implicacions en el múscul esquelètic el convertien en un bon candidat per a continuar l'estudi i una possible diana terapèutica. És per això que s'ha comprovar la seva expressió a nivell proteic veient que no només es confirma l'augment de de p75^{NTR}



a causa de l'E2 si no que l'exercici també està produint una diferència significativa entre els dos grups d'animals placebo. A més, els resultats de la immunofluorescència revelen la seva localització a la membrana de fibres regenerants, tal i com s'havia descrit, però també a alguns nuclis. Aquest mateix any, s'ha descrit que p75^{NTR} és un marcador de cèl·lules progenitores miogèniques²⁰⁶, així que molt probablement el que es visualitza són cèl·lules satèl·lit progenitores. Per visualitzar-ho correctament, caldria fer una co-immunofluorescència amb marcatge específic per les cèl·lules satèl·lit.

El resultat més novedós d'aquest treball és la relació entre els estrògens i p75^{NTR}. Per tal de veure que l'E2 induïa l'expressió d'aquesta proteïna, vam comprovar els nivells d'expressió d'ARNm d'aquest gen en ratolins *mdx* mascles i femelles de 3 edats diferents. Sabent que els nivells d'E2 en les femelles són més alts en tots tres punts d'edat, es veuen nivells més alts d'expressió de p75^{NTR} a 5 setmanes i 3 mesos però no a 6 mesos. Com a explicació a aquest punt, la hipòtesi més clara és que a partir dels 6 mesos hi ha una disminució de la regeneració i una reducció del nombre de cèl·lules satèl·lit. En futurs estudis, es podria abordar aquesta qüestió i determinar els nivells d'E2, l'evolució a nivell histològic i el nombre de cèl·lules satèl·lit a diferents edats en ratolins *mdx* mascles i femelles.

Analitzant el promotor de p75^{NTR} resulta que la seva seqüència és molt similar en ratolins, rates i humans però els seus elements reguladors en *cis* no estan ben definits. Presenta diverses illes CpG a prop del codó d'iniciació ATG. Altres zones específiques del promotor, llocs d'unió per a la regulació de la transcripció de p75^{NTR}, són susceptibles a l'àcid retinoic, la vitamina D3 i la testosterona.²⁰⁰ Res se sap de llocs de resposta al receptor d'estrògens, per això, es va fer un anàlisi de predicció de llocs d'unió del factor de transcripció corresponent al receptor d'estrògens α (ER α) pel gen p75^{NTR} del genoma del ratolí, amb el *software* ConTra.²⁰⁷ S'ha pogut comprovar que es prediuen diversos llocs d'unió al llarg de la seqüència de p75^{NTR} (figura 98). Això significa que l'expressió d'aquest gen s'indueix per l'exposició als estrògens.

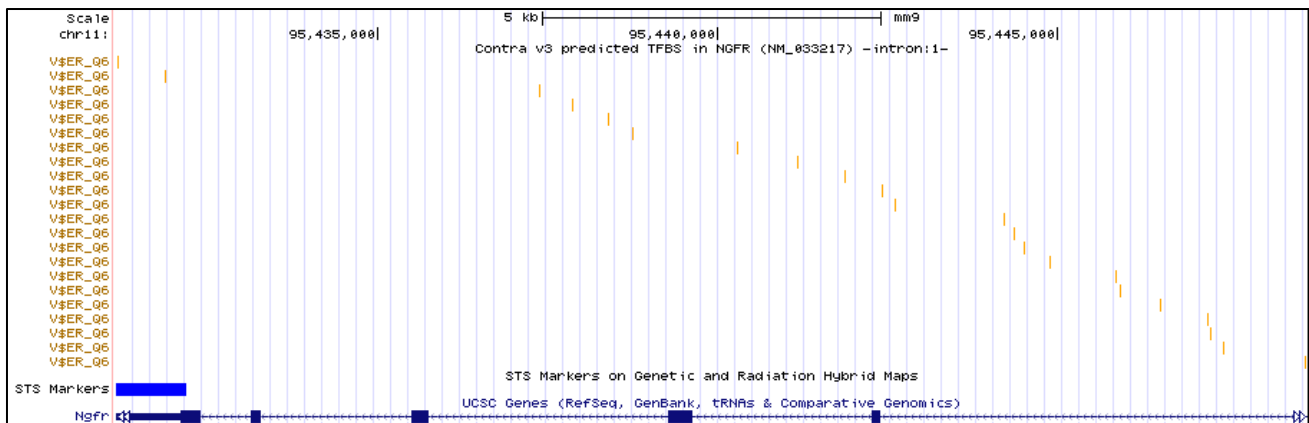


Figura 98: Predicció dels llocs d'unió del receptor ER α al llarg del gen p75^{NTR}.

Estudi dels lligands de p75^{NTR}

Les neurotrofines (NT) són factors de creixement implicats en diverses funcions, incloent supervivència, proliferació, diferenciació i apoptosi. La primera neurotrofina identificada va ser NGF (de l'anglès, *Nerve Growth Factor*)²⁰⁸ i les altres neurotrofines, BDNF (de l'anglès, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), NT-3 i NT-4/5, van ser identificades 30 anys més tard. Les neurotrofines medien els seus efectes a través de la unió a dos classes de receptors transmembranes, els Trk (A, B i C) i el receptor de baixa afinitat p75^{NTR}. Tal i com es pot veure a la figura 99, NGF és el lligand preferent de TrkA, BDNF i NT-4/5, el de TrkB i NT-3, el de TrkC però no és exclusiu, ja que NT-3 també és lligand per TrkA i TrkB. I totes elles, poden unir-se al receptor p75^{NTR} amb igual afinitat.²⁰⁹ A més, els dos receptors poden interaccionar i dur a terme la seva funció junts. L'expressió dels receptors i les neurotrofines en les fibres del múscul esquelètic duen a la hipòtesi de que aquestes poden tenir algunes propietats funcionals en aquest teixit.

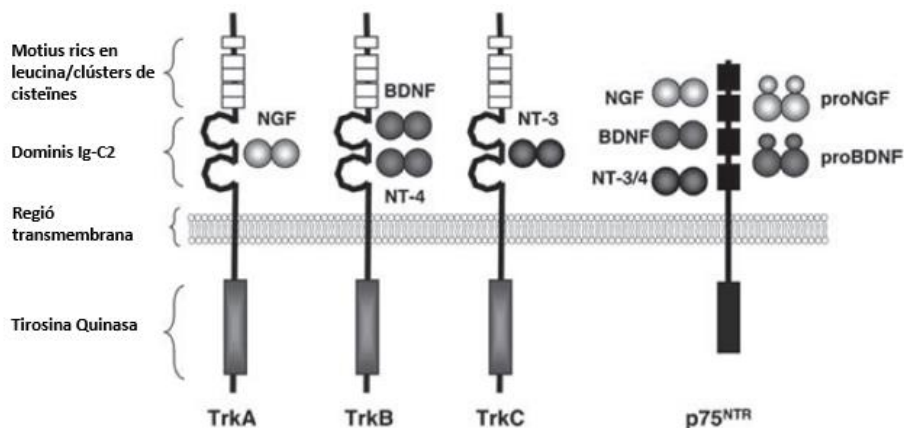


Figura 99: Neurotrofines i els seus receptors.
Imatge extreta de Arevalo, J.C., et. al. 2006

Durant aquest treball s'ha hipotetitzat que els efectes de l'E2 sobre el múscul esquelètic es basen en la promoció de la supervivència cel·lular. Des de fa molt, es coneixen els efectes del receptor p75^{NTR} iniciant la mort cel·lular, però en aquests últims anys s'ha descrit evidències de que NGF protegeix les neurones corticals en cultiu, les quals només expressen p75^{NTR}, de la citotoxicitat induïda per glutamat. També s'ha vist la unió de NGF a aquest receptor com a mecanisme de protecció de les neurones corticals i hipocampals.²⁰⁰ S'ha vist els mateixos efectes en molts d'altres tipus cel·lulars.

En el múscul, resultats experimentals indiquen que les neurotrofines (particularment, NGF) estan involucrades en la regeneració muscular. De fet, NGF millora la capacitat regenerativa de les cèl·lules satèl·lit en el múscul distròfic.²¹⁰ A més, el fenotip del ratolí *knockout* per NGF presenta una atrofia del múscul esquelètic i una distròfia en el ratolí adult.^{211,212} Associacions funcionals semblants s'han descrit per la neurotrofina BDNF però amb resultats menys concloents.²¹³

Tenen un interès particular els descobriments que mostren que la senyalització per p75^{NTR} és requereix per a la correcta funció de les cèl·lules satèl·lit i la reparació muscular. En aquest estudi, la inhibició de la senyalització mitjançant el bloqueig de NGF afecta negativament la fusió dels mioblastes i l'organització del citoesquelet.²⁰²

Sembla ser que p75^{NTR} estaria promovent les vies de supervivència activant per mitjà de mecanismes que involucren PI3K i Akt, igual que els estrògens.²¹⁴

Unificant, tots aquests resultats suggereixen que en el múscul esquelètic, l'expressió de NGF pot ser capaç d'activar i afavorir el procés de regeneració.

Però llavors, com és que no surt sobreexpressat NGF? Curiosament, un dels altres gens sobreexpressats pel tractament amb E2 és MMP-9, que s'ha descrit que degrada la forma madura de NGF. Té sentit pensar que el nostre tractament està potenciant la via de senyalització de supervivència mitjançada per NGF-p75^{NTR} i que el cicle de generació-maduració-degradació de NGF és tan ràpid que no s'aconsegueixen percebre els canvis d'expressió. Sembla que podria ser així perquè també està descrit que el propi NGF pot induir l'expressió de MMP-9.²¹⁵

p75^{NTR} està sobreexpressat en pacients amb DMD

L'interès de qualsevol d'aquestes molècules detectades com a possible diana terapèutica, serà més o menys viable en funció de si en el múscul humà es reproduïen els mateixos aspectes que s'han estudiat en el ratolí. En el cas de la DMD és difícil que això passi degut a les grans diferències fenotípiques entre el ratolí i l'humà.

Tot i això es va plantejar veure com es trobava p75^{NTR} en els músculs de pacients amb DMD respecte als seus controls. Les biòpsies s'extreuen de la col·lecció privada del laboratori de Neurologia Pediàtrica i s'obtenen en el moment del diagnòstic quan els pacients encara no han pres glucocorticoides.

Està descrit que en el múscul de pacients amb DMD, NGF s'expressa en fibres regenerants i en miofibroblast.²¹⁶ Les fibres madures que no estan regenerant, així com les fibres dels controls, no presenten expressió per NGF. A més, p75^{NTR} es troba en el múscul humà tant patològic com normal (en aquest cas, només en les cèl·lules musculars de fetus de 12 a 22 setmanes d'edat). En el múscul de les distròfies musculars, es pot apreciar marcatge per p75^{NTR} a les fibres regenerants,^{196,197} igual que s'observa en els resultats d'aquest treball.

De tot això s'extreu que aquest receptor és essencial per a la regeneració muscular en les distròfies però sembla que també en el desenvolupament del múscul normal. Com ja hem dit, en el ratolí també es produeix el mateix patró d'expressió. Llavors, per què només veiem sobreexpressió a l'exposar el múscul a E2?

La hipòtesi que es planteja en aquest treball és que la diferència de fenotip entre les dues espècies ja seria suficient per produir aquestes diferències. En el múscul de pacients amb DMD es produeix una major degeneració i inflamació que en els ratolins *mdx* i s'ha descrit que p75^{NTR} està sobreexpressat en el múscul de diferents miopaties inflamatòries *in vivo* promovent la resistència a la inflamació i la mort.²¹⁷ Curiosament, en aquest estudi no s'ha vist sobreexpressió d'aquest receptor en les distròfies.

També existeix una teoria que postula que es produeix una hiperestrogenèmia en els pacients amb DMD²¹⁸, però aquesta correlació encara està per acabar de determinar.

La modulació de p75^{NTR} per mitjà del LM11A-31

Tenint en compte totes les implicacions de p75^{NTR} en el múscul esquelètic, es va postular que part dels efectes de l'E2 també podien estar mediat per la modulació d'aquest receptor. D'aquesta manera, s'afegeix una nova teoria a la funcionalitat de les hormones sexuals.

És per això que es va dissenyar un tractament amb una molècula petita moduladora del receptor, el LM11A-31. Aquest fàrmac té un perfil d'agonista parcial d'aquest receptor que en assajos d'unió ha demostrat que desplaça l'NGF de la unió a p75^{NTR} però no de TrkA. A més, s'ha demostrat que promou la senyalització de les vies de supervivència.¹²¹ Amb aquesta modulació s'ha demostrat el seu efecte positiu en la malaltia d'Alzheimer i en la lesió cerebral traumàtica.^{122,123}

La reducció dels nivells de CKs en animals tractats amb LM1A-31 respecte els controls dóna suport a la hipòtesi de que la via activada per p75^{NTR} promou part dels efectes observats per l'E2. Encara que aquesta diferència no va ser estadísticament significativa, probablement a causa del reduït nombre d'animals analitzats (gran desviació estàndard), la disminució dels nivells de CKs en animals tractats amb LM11A-31 és clara, cosa que indica una millora en aquest marcador de dany muscular. Un altre marcador de millora és l'assaig funcional, en el qual es pot observar diferències en el temps de suspensió al dia 14 del tractament, coincidint amb el pic de necrosi - regeneració que es produeix a la setmana 5 d'edat. Això podria significar que en aquesta etapa de la malaltia, LM11A-31 redueix els fenòmens de necrosi i regeneració en animals tractats.

També es s'han analitzat canvis histològics en el múscul esquelètic i no s'han observat diferències en aquest tret, però això és atribuïble a la curta durada del tractament i l'edat jove dels ratolins. Segurament s'haurien de realitzar tractaments de més llarga durada, tant amb l'E2 com en el LM11A-31, per veure diferències en les característiques típiques de dany muscular a nivell histològic.

Després, els nivells de p75^{NTR} han estat avaluats en animals tractats amb LM11A-31 pels que no s'ha trobat canvis en els nivells p75^{NTR} ni en l'ARN ni en els nivells de proteïnes. Aquest resultat significa que el fàrmac actua a través del receptor que activa la via descendent, però sense provocar una sobreexpressió de p75^{NTR}, almenys després d'un tractament de curta durada. Tampoc s'ha observat diferències per l'expressió de NGF.

Finalment, s'ha analitzat l'expressió de gens relacionats amb l'administració de calci de RS i tots els implicats en la via de senyalització estudiada pel tractament d'E2. Malauradament, no hi ha diferències en cap d'aquests paràmetres, per la qual cosa els mecanismes subjacents al tractament segueixen sent indeterminats.

Amb aquest treball, hem valorat la importància de l'augment de p75^{NTR} en ratolins mdx, però encara desconeixem els seus mecanismes d'acció. Aquest receptor té múltiples lligands, co-receptors i vies de senyalització associades, que hauran d'analitzar-se més profundament en el futur per demostrar que p75^{NTR} és una diana vàlida per a la distròfia muscular Duchenne. Tot i això, la modulació de p75^{NTR} no aconsegueix tenir els mateixos efectes que l'E2 en el múscul esquelètic.

Resum

Posant tot l'anterior en context, sembla que els estrògens poden estar frenant el fenotip distròfic per tots els mecanismes descrits.

Veient els seus efectes sobre els nivells de CKs i els acúmul de calci, sembla que l'E2 estaria estabilitzant la membrana sarcoplasmàtica per la seva estructura semblant al colesterol, intercalant-se en ella. Però també pot ser que aconsegueixi estabilitzar la membrana per mitjà de la sobreexpressió d'una proteïna substitutiva de la distrofina, la utrofina.

Sembla evident també que es troba promovent la supervivència per mitjà de les vies de senyalització *downstream* que està activant. El mecanisme s'inicia per la interacció de les hormones amb l'ER α que activa la transcripció de molts gens però també activa la via de senyalització de PI3K/Akt. A més, mitjançant la sobreexpressió de p75^{NTR} podria exercir una acció redundant sobre la supervivència de les fibres musculars.

Però resulta evident que la modulació única del receptor de neurotrofines no aconsegueix els mateixos efectes que l'E2. Tot i això, encara caldria dilucidar per quins mecanismes més pot estar actuant p75^{NTR} en el múscul esquelètic.

Unint tots aquests resultats, es pot comprovar que l'E2 té una acció molt important en la regulació de les cèl·lules satèl·lit perquè, més enllà de l'increment de Pax7⁺ observat, p75^{NTR} i MMP-9 també són marcadors de cèl·lules satèl·lit.^{206,219}

Pel que fa a l'exercici, tot i que està descrit que potencia l'acció dels estrògens en el

múscul esquelètic dels ratolins, en aquest treball ens mostra respostes contraposades. La hipòtesi que es postula és que amb l'exercici aconseguim fer més patents els trets patològics del *mdx* i fer més patents alguns dels efectes de l'E2 sobre aquests trets. Però la potenciació dels cicles de necrosi-regeneració emmascara alguna conseqüència del tractament de l'E2, com la regulació sobre les cèl·lules satèl·lit o l'augment en la utrofina o la miogenina. Per tant, la introducció de l'exercici en l'estudi de l'aplicació de nous tractaments per a DMD, dependrà del tipus de resposta que es vulgui assajar.

Perspectives de futur

.Com ja s'ha comentat a l'inici d'aquesta discussió, no és possible tractar els nens afectes amb DMD amb hormones sexuals però mimetitzar els efectes que té l'E2 en el múscul esquelètic podria ser una bona estratègia terapèutica.

Per això, la modulació dels receptors d'estrògens pot ser la peça clau. Per dur a terme aquesta funció existeixen els moduladors selectius dels receptors d'estrògens (SERMs de l'anglès, *Selective Estrogen Receptor Modulator*). Els SERMs són compostos que exhibeixen diferents nivells d'activitat agonista o antagonista pels ER en els diferents teixits. Són molècules no-esteroidals químicament diverses que presenten una estructura terciària que no interfereix en la unió dels ER. El més conegut és el Tamoxifè, un agent quimiopreventiu del càncer de mama en dones amb alt risc de patir-ne. L'any 2000, se'l va reconèixer com la droga d'elecció pel tractament del càncer de mama ER-positiu. A més d'aquests efectes antiestrogènics a la mama, el tamoxifè mostra un efecte agonista als estrògens als ossos. Aconsegueix la preservació de la densitat mineral òssia en dones post-menopàusiques però l'ús del tamoxifè amb aquesta finalitat no és possible per la seva elevada activitat estrogènica al teixit endomètric, resultant en una taxa major d'hiperplàsia endometrial i risc de càncer d'endometri.

Un altre SERM és el Raloxifè, usat per la prevenció de l'osteoporosi i el primer en obtenir la aprovació de la FDA (de l'anglès *Food and Drug Administration*) d'E.E.U.U., per a aquesta indicació.²²⁰

En el nostre grup es va intentar imitar el mateix procediment que en el tractament amb E2, però amb pellets contenint Tamoxifé. Per algun motiu, aquests pellets eren rebutjats i expulsats del cos de l'animal (figura 100), pel que va resultar impossible realitzar aquests

experiments.

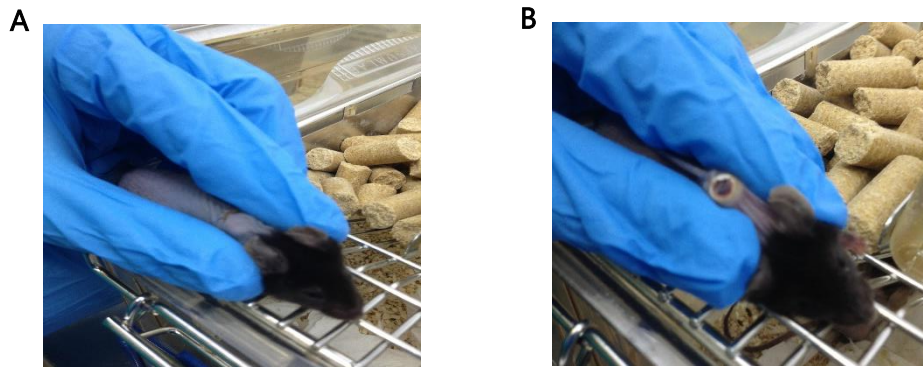


Figura 100: Intent de tractament amb pellets contenint Tamoxifè.

(A) Animal amb pellet placebo, que no l'expulsa. (B) Animal amb pellet de Tamoxifè expulsant-lo.

Tot i això, està descrit que el Tamoxifè frena el fenotip distròfic del ratolí *mdx*. El tractament amb aquest compost durant 15 mesos aconsegueix una millora en la força de l'animal i una reducció de la fibrosi en diafragma i cor.²²¹ A més, s'ha descrit que activa la via de senyalització de PI3K/Akt, pel que podria ser que actués en el múscul esquelètic igual que ho fan els E2.²²²

Discussió del tractament amb PTC124 i ús de NPs

En el 10% dels pacients amb DMD, la causa genètica de la patologia és una mutació *nonsense*, que provoca l'aparició prematura d'un codó STOP (PTC, de l'anglès *Premature Termination Codon*).⁸⁸ Però no és l'única patologia en les que es produeix aquesta relació, en la Fibrosi Quística, entre d'altres, també està descrit un percentatge de mutacions *nonsense* semblant.²²³ Pel que trobar un compost amb la capacitat d'incorporar un aminoàcid qualsevol evitant la terminació prematura de la pauta de lectura (activitat *read-through*) podria ser molt útil per moltes malalties genètiques.

Acció del PTC124

A part dels aminoglicòsids, antibiòtics amb aquesta activitat *read-through* de forma natural però presenten elevats efectes de toxicitat i no poden ser utilitzats amb aquesta finalitat. És per això que un dels fàrmacs més utilitzats ha estat el PTC124 (Ataluren). Tot i que, des dels seus inicis, la seva efectivitat ha estat motiu de grans controvèrsies. Encara que alguns estudis qüestionen si el PTC124 presenta activitat *read-through*^{224-226,94,227}, també hi ha altres publicacions independents que demostren aquesta activitat amb aquest compost en diversos models cel·lulars i animals,^{228,229,90} alguns d'ells en DMD^{93,230}. En aquest context de resultats contradictoris, obtinguts tant a partir d'experiments *in vitro* com *in vivo*, el mecanisme d'acció de PTC124 encara no està ben establert. S'ha postulat que el PTC124 actua sobre el ribosoma i produeix una proteïna completa per la promoció de la inserció d'ARNt al lloc del codó STOP sense efectes aparents en la transcripció, el processament de l'ARNm o l'estabilitat de l'ARNm o la proteïna.^{231,92}

En les nostres mans, no s'ha vist cap activitat *read-through* en els animals tractats. De fet, sorprenentment, s'observa una major quantitat de fibres distrofina-positives en els animals injectats intraperitonealment amb Dimetil Sulfòxid (DMSO). En aquest aspecte, són àmpliament coneguts els efectes antiinflamatoris i antioxidants del DMSO^{232,233} però a més s'ha descrit que aquest compost pot alterar les propietats contràctils del múscul esquelètic²³⁴ i els nivells d'expressió de gens relacionats amb la miogènesi²³⁵ a concentracions més baixes que el 20% que s'ha utilitzat en el nostre experiment. A més, s'ha descrit que l'administració intramuscular de DMSO pot alterar la regeneració muscular i s'estableix la dosi intramuscular sense efectes a 0,1% de DMSO.²³⁶ Tot i això,

caldrien estudis més en profunditat per entendre per quin mecanisme podria activar-se l'expressió de distrofina o per quin motiu se'n detecta més.

El fàrmac PTC124 és altament insoluble i és per això, que s'utilitza el DMSO. Però veient els seus efectes sobre el múscul esquelètic s'hauria de plantejar la recerca d'un nou vehicle en el que dissoldre el fàrmac.

Ús de nanopartícules

La hipòtesi que podia explicar la falta d'efectivitat del PTC124 plantejada per el nostre grup, es basava en que l'administració intraperitoneal del fàrmac no aconseguia que aquest arribés al teixit diana, el múscul esquelètic. Per això es va plantejar l'ús d'alguna estratègia d'alliberament específic a múscul.

Es van seleccionar les nanopartícules aportades pel grup de l'Institut Químic de Sarrià (IQS) per provar aquestes aproximacions. Els primers estudis van consistir en veure com es distribuïen les NPs per l'organisme.

Les primeres NPs amb les que es va fer l'estudi, MSNs, van demostrar una preferència d'acumulació als teixits inflamats de forma aguda o crònica. Concretament, s'observava un alt marcatge per les MSNs a les extremitats posteriors. Tot i això, aquestes NPs s'acumulaven molt en els òrgans del sistema mononuclear fagocític i en els teixits d'eliminació de fàrmacs, el que indicava una ràpida degradació i eliminació de les partícules de l'organisme. D'aquesta manera es reduïen molt les opcions de que en cas d'utilitzar aquests MSNs carregades amb fàrmac, aquest es mantingués molt de temps al torrent sanguini i pogués realitzar les seves accions.

És per això que aquestes MSNs van ser funcionalitzades afegint-hi polímers biodegradables (PEG) a la seva superfície (MSNsPEG). D'aquesta manera es redueix l'agregació i l'acumulació a òrgans d'eliminació del fàrmac però segueix veient-se presència de NPs a múscul esquelètic inflammat.

Aquest fet, l'acumulació a teixits inflamats i més permeables gràcies a l'efecte de permeabilitat i retenció (EPR), és molt útil de cara a l'administració de qualsevol fàrmac que es necessiti que arribi específicament a múscul. Així que en cas de que no es pugui confirmar l'efectivitat del fàrmac estudiat, el PTC124, pot ser igualment una bona estratègia d'alliberament a múscul esquelètic per tot el que es vulgui assajar en un futur.

Quantificació de distrofina

Després d'aquests resultats, es van carregar les MSNsPEG amb PTC124 i es van tornar a injectar en ratolins *mdx* per veure si s'incrementava l'efectivitat del fàrmac. En aquest cas, tampoc es van poder veure diferències en el nivell de distrofina entre els animals de les dues condicions. Pel que no sembla que augmentant la disponibilitat del PTC124 al múscul s'aconsegueixi veure activitat *read-through*. Tot i això, només tenim clar que les MSNsPEG arriben a múscul esquelètic però no sabem en quin moment aquestes NPs alliberen el fàrmac dins de l'organisme ni si ho fa al teixit diana. La presència de PTC124 s'havia d'avaluar mitjançant HPLC a l'IQS però les mostres es van perdre per un accident amb un congelador. Ha quedat pendent agafar un nou fragment dels múscul per fer aquesta quantificació.

La presència de grup de fibres distrofina-positives en tots el animals estudiats, molt possiblement es degui a que els ratolins *mdx* presenten un fenomen pel qual es produeix un mecanisme *read-through* natural i una cèl·lula comença a expressar distrofina completa. Les fibres que derivin d'aquesta, també expressaran distrofina. Aquest conjunt de fibres es coneix com a Fibres Revertents.¹⁵⁷

Tot això genera qüestions molt importants, de cara a l'ús del PTC124 o qualsevol altre fàrmac. La primera d'elles és quanta distrofina es necessita per convertir un pacient amb DMD a un BMD. Un estudi exhaustiu de pacients amb DMD i BMD ha permès quantificar els nivell de Distrofina, definint que els pacients amb BMD presenten del 10 al 90% d'expressió de distrofina amb una mitjana del 33%, mentre que els DMD presenten una mitjana del 1,3%, variant entre el 0,7 i el 7%.²³⁷ Segons aquestes dades, es determina que es necessita un 10% d'expressió de distrofina per convertir un DMD en BMD.²³⁸ Per tant, per futurs estudis s'han de tenir en compte aquests valors per determinar si un tractament es prou efectiu incrementant la producció de distrofina.

Per dur a terme aquests futurs estudis, caldrà posar a punt tècniques que ens permetin la quantificació acurada dels nivells de proteïna ja, que les tècniques comunes utilitzades en aquest treball no són suficientment sensibles a l'hora de la detecció. Pel que aplicar noves tècniques com les immunofluorescències d'elevat rendiment o l'immunoassaig per capil·laritat Western, seran claus en la valoració de l'efectivitat dels tractaments.^{237,239}

La segona qüestió a tenir en compte és que les cèl·lules presenten un mecanisme natural

de reconeixement i degradació d'ARNm quan es produeixen codons STOP prematurs, el *Nonsense Mediated Decay* (NMD). Aquest, no només és un sistema de control de qualitat cel·lular que prevé la formació de proteïnes aberrants si no que ajuda a les cèl·lules dels mamífers a ajustar dinàmicament els seus transcriptomes i proteomes a condicions patològiques. Degut a això, molts cops s'ha discutit que podria ser que els nivells d'ARNm de la distrofina a pacients amb mutacions *nonsense* fossin tan baixos, per acció del NMD, que el PTC124 no té material en el que realitzar les seves accions. No obstant, recentment s'ha descrit que l'ús d'inhibidors del NMD no aconsegueix augmentar l'activitat *read-through* del PTC124.²⁴⁰ Pel que altres estudis serien necessaris per confirmar la validesa d'aquesta hipòtesi en la DMD.

També cal tenir en compte que, degut als efectes que s'han descrit de l'exercici en la regeneració del múscul esquelètic, no seria del tot estrany pensar que pugui jugar algun paper en el que observem en aquests resultats. Tot i no veure diferències en el rendiment dels tests funcionals, podria ser que l'exercici influeixi en la presència de fibres revertents. Un estudi correlatiu entre exercici i presència de fibres revertents seria necessari per comprovar aquestes possibles implicacions.

Perspectives de futur

De cara al futur seria important comprovar l'activitat *read-through* en cèl·lules deficientes en distrofina, tant de ratolí *mdx* com de pacient amb DMD, ja que molts dels estudis que han demostrat l'efectivitat del PTC124 s'han realitzat en cultius cel·lulars.^{228,90}

La necessitat de trobar fàrmacs amb capacitat *read-through* que permetin trobar una teràpia per les mutacions *nonsense* i sobretot per malalties sense cura com el DMD, ha permès trobar d'altres fàrmacs com els RTC13, RTC14, derivats del PTC124 o d'altres.^{90,241}

La confirmació de l'efectivitat d'algun d'aquests fàrmacs pot obrir la porta a la teràpia de pacients no només amb malalties neuromusculars, si no també de moltes altres patologies amb implicació genètica.

Discussió del diagnòstic genètic de pacients amb NMD

Avui en dia, la falta de teràpies definitives per la majoria dels trastorns neuromusculars (NMD) li donen una importància majúscula a conèixer les causes genètiques d'aquests trastorns. Determinar això és essencial per produir una millora en la gestió dels símptomes i complicacions i assolir una assistència més personalitzada. A més, un diagnòstic genètic ràpid proporcionarà un assessorament genètic de major qualitat a les famílies i facilitarà l'accés a la teràpia o la inclusió en assaigs terapèutics, dissenyats per un grup específic de variants en edats concretes.

Com ja s'ha comentat durant la introducció, el diagnòstic dels NMD resulta complicat degut a que presenten: una gran quantitat de gens causants (heterogeneïtat genètica), associació de múltiples gens amb fenotip similar o un sol gen amb múltiples fenotips (heterogeneïtat fenotípica), ocurrència de diversos tipus de variants patogèniques al llarg de la longitud de cada gen (heterogeneïtat al·lèlica), i, finalment, les mides enormes de la majoria de gens dels NMD com DMD, DYSF, TTN, LMNA, RYR1 i molts més. És per això que les noves tècniques de seqüenciació massiva (NGS) permeten abordar aquestes dificultats d'una manera més efectiva i econòmica, a l'hora que augmenta la descripció de nou gens associats a patologies.

Degut a l'elevat nombre de pacients sense diagnòstic de l'àrea de Trastorns Neuromusculars del Servei de Neurologia Pediàtrica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, es va plantejar l'aplicació del NGS amb la finalitat de millorar en aquest aspecte. La primera tècnica que es va seleccionar va ser l'exoma complet. Es van seleccionar 12 pacients i es van seqüenciar en format *singleton* (tan sols el cas índex) i dels quals només se'n van resoldre dos casos.

Aquest baix èxit és degut a que es tractava de les primeres plataformes d'exoma complet (WES) sorgides al mercat, els quals presentaven uns nivells de cobertura molt baixos de determinades regions, sobretot aquelles regions que són riques en GC en les que la cobertura pot no arribar a 10X i d'aquesta manera, no detectar moltes variants.^{242,243} A més, el poc coneixement sobre el tema i la manca de bases de dades relacionades, dificultava la interpretació dels resultats.

Degut a això, es va plantejar l'ús d'una altra tècnica de NGS, el panell de gens TruSight One (TSO). El seu ús sobre 32 mostres va permetre diagnosticar 17 d'elles, 4 de les quals

havien estat seqüenciades prèviament per WES, demostrant que la baixa cobertura d'algunes regions junt amb la manca d'eines per a l'anàlisi d'un nombre massiu de dades, del test anterior feia passar per alt les variants patogèniques d'aquests pacients. Amb el panell TSO s'incrementava la cobertura²⁴⁴ i s'assolia una taxa d'èxit del 50% dels pacients escanejats.

Donats aquests resultats sembla que l'ús de WES pel diagnòstic rutinari presenta diversos inconvenients pel que fa al disseny, la cobertura, l'anàlisi i la validació de variants, així com pel rendiment i el preu. En canvi l'ús de panells permet augmentar l'enriquiment d'exons difícils de capturar o incorporar regions amb mutacions intròniques conegudes, obtenint una cobertura més alta i un llistat de variants reduïts (ja que se centra en un subconjunt de gens candidats).²⁴⁵ La millora en el diagnòstic genètic que representen els panells ja ha estat descrita prèviament, on es troba que el rendiment diagnòstic d'aquesta tècnica és 3 cops més que per Sanger tradicional i que a més, aproximadament el 18% de les variants patogèniques es poden perdre si s'aplica la seqüenciació per WES.²⁴⁶

Reanàlisi

La disponibilitat de les dades generades per seqüenciació tant per WES com per panells obren la possibilitat a futurs reanàlisi, acció que ha resultat essencial en el diagnòstic d'alguns dels pacients d'aquest treball. Per reanàlisi en aquest treball entenem l'aplicació de nous *pipeline* de processament de dades, que pot influenciar la troballa de variants.²⁴⁷ Com ha estat el cas del pacient 5, al que se li va trobar una mutació al gen *SEPN1* amb l'aplicació del *pipeline* usat pel reanàlisi de dades del projecte PERIS.

Però també és reanàlisi el refiltratge pel llistat de gens actualitzat. Com s'ha comentat, cada any es descriuen nous gens associats amb fenotips neuromusculars, pel que en els casos negatius és essencial aquest reanàlisi. Però a més, implica que els panells de gens s'han de mantenir actualitzats, cobrint tots els gens descrits, de manera que segueixin sent rentables. Aquest tipus de reanàlisi és el que es va aplicar en el pacient 33, heterozigot compost pel gen *COG6*, recentment descrit associat a Neuropaties amb insensibilitat al dolor.

Finalment també considerem reanàlisi, l'inspecció exhaustiva de totes les variants trobades en un gen candidat, revisant conservació, freqüències i predictors de

patogenicitat per tal de no descartar cap variant. És el cas del pacient 7, en el que l'estudi d'una variant sinònima i la seva validació funcional en l'ARNm ha permès fer el diagnòstic acurat.

Tots aquests aspectes de reanàlisi resulten essencials pel 30-50% dels casos que queden sense diagnosticar amb l'ús de les tècniques de NGS.²⁴⁸ I això és un testimoni de la necessitat de millorar la comprensió de tots els aspectes del genoma humà, ja que les nostres deficiències actuals, probablement es deuen a que les habilitats d'interpretació es limiten a variants ubicades a exons codificants i a regions límit intró-exó. En altres paraules, actualment tenim una limitació en interpretar possibles variants patogèniques en regions no codificants i reguladores del genoma.⁴⁷

Importància de les validacions

En els nostres estudis, sempre es realitza una validació per seqüenciació Sanger per tal de veure el patró d'herència i determinar si els progenitors en són portadors. En qualsevol cas, les mutacions que es troben per NGS també han de ser validades per descartar els errors de seqüència introduïts durant el protocol NGS, per proporcionar una segona confirmació independent i una base per a una prova simplificada per a un altre assessorament dins de la família.^{245,249,250}

Rendiment de les tècniques de NGS

En l'aplicació de NGS pel diagnòstic de malalties mendelianes s'ha descrit que es resolen un 25% dels casos.²⁵¹ En canvi, en els NMD s'ha vist que aquest percentatge augmenta al 48-50%.²⁵²

A què es pot deure aquesta millora en el rendiment del diagnòstic genètic?

Actualment les proves genètiques estan guiades pel fenotip clínic del pacient en combinació amb els resultats de la ressonància magnètica muscular, l'electromiograma (EMG) i la biòpsia muscular. S'ha discutit molt sobre si la biòpsia muscular pot ser prescindible pel diagnòstic però per la experiència en NMD, és necessari perquè dona indicis de quina patologia pot ser. En el cas, per exemple, de la miopatia nemalínica, l'observació de cossos nemalínics a la biòpsia muscular és essencial. També es pot necessitar una biòpsia muscular per verificar l'efecte d'una variant genètica específica

sobre la presència, ubicació i funció de proteïnes. Això s'ha tornat cada vegada més important a l'hora de classificar noves variants en gens coneguts per causar malalties musculars , i també per confirmar la patogenicitat de les variants en gens nous o de significat incert.

De fet, dels resultats exposats en aquest treball s'extreu que com més dirigit vagi el diagnòstic clínic (més concloents siguin aquestes proves clíniques), més probabilitat de trobar la causa genètica. De fet, en el cas dels defectes congènits de glicosilació (CDGs), la seqüenciació d'un sol gen té més èxit que l'ús de panells (21,2% versus 5,8%). Això és atribuïble a que els fenotips solen ser molt específics d'un gen concret i l'ús de tests bioquímics que impliquen un gen específic.²⁴⁶ Tot i que les proves bioquímiques i el fenotip clínic poden ser molt específics per a determinats CDGs, sovint això no ho és tant per als NMD.

Totes les dades anteriorment exposades han d'ajudar a definir quina tècnica utilitzar pel diagnòstic genètic i demostren que és imprescindible la implicació de totes les disciplines per a seleccionar la millor aproximació.

Una forma d'incrementar el rendiment de les tècniques NGS és realitzar la seqüenciació en trios (proband i els dos progenitors). Això ens permet determinar quina variant s'hereta dels pares, així com identificar les mutacions espontànies de les línies germinals que es coneixen o poden causar una malaltia genètica dominant. Aquesta estratègia ha accelerat la taxa de detecció de les mutacions *de novo* com la causa subjacent de la malaltia genètica dominant. Alhora, les dades de segregació permeten reduir el nombre de variants a considerar, facilitant la detecció de causes noves de les malalties. El principal desavantatge d'aquest enfocament és el triplicat dels costos de seqüenciació.⁴⁷

Anàlisi funcional de variants amb significat incert

En l'anàlisi per NGS, s'ha reportat que es detecten $2-4 \times 10^5$ variants d'un sol nucleòtid per persona, de les quals 4-9 de significat incert relacionats amb la malaltia i 300-600 VUS no relacionades amb la malaltia.²⁴⁸ Tot i que existeixen diferents aproximacions en la anotació de les variants,²⁵³ és necessari realitzar estudis complementaris per comprovar la implicació funcional d'aquestes mutacions sobre les proteïnes que codifiquen.

És per això que en el nostre treball, ha estat indispensable avaluar la patogenicitat de 4

mutacions que es predeia que afectarien l'*splicing*. Aquest estudi s'ha pogut realitzar perquè es disposava de biòpsia muscular dels pacients. La mostra de la biòpsia es pot utilitzar per identificar l'abundància de proteïnes, la ubicació de les proteïnes, així com per als estudis funcionals en l'ARNm. Fer-ho ens ha permès confirmar els diagnòstics i veure que les mutacions sinònimes, molts cops s'han de tenir en compte quan se sospita d'un gen candidat molt clar però no se'n troba la variant. En el cas del pacient 7 la mutació sinònima que presenta produeix l'activació d'un lloc críptic d'*splicing* i la deleció de la part final de l'exó en l'ARNm de la nebulina.

S'ha descrit que les mutacions sinònimes poden alterar no només l'*splicing* si no també l'estructura i estabilitat de l'ARNm i l'expressió, conformació i funció proteica.²⁵⁴ Pel que en futurs estudis s'ha de tenir en compte aquest tipus de mutacions pel diagnòstic genètic.

Casos dubtosos

A part dels casos positius i ja diagnosticats que s'han exposat, hi ha 3 pacients amb diagnòstics dubtosos.

Els casos dubtosos ho són per motius diferents. En el cas del pacient 13: presenta una mutació *missense* que causa un *frameshift* en un gen (MTMR14) amb herència dominant. El motiu pel qual és dubtós és que la mare també és portadora d'aquesta variant. Tot i això, no s'acaba de descartar i s'hauria de realitzar estudis moleculars per determinar la patogenicitat. S'ha descrit en altres patologies, com la miopatia congènita per dèficit de Ryr1, que a teixit específic (en aquest cas, múscul) només s'expressa un al·lel, l'altre se silencia. En alguns pacients portadors d'una variant, se silencia l'al·lel que no duu la mutació de manera que la inactivació actua com a mutació recessiva.²⁵⁵ Pel que en futurs estudis es podria realitzar un assaig similar al descrit per Ryr1 per determinar que pot passar amb el gen MTMR14, perquè un cas de penetrància incompleta no lliga amb un patró de dominància.

Els altres dos casos, 3 i 6, el motiu és diferent. A tots dos se'l s'hi va detectar variants al gen de la TTN, un dels gens més grans del genoma amb 363 exons. Això el fa inabordable pels predictors de patogenicitat i la majoria de variants detectades en aquest gen resulten de significat incert, pel que les mutacions *nonsense* o *frameshift* són

considerades causes de la patologia però la resta de mutacions cauen en la incertesa, igual que el diagnòstic d'aquests pacients. Hi ha grups treballant en l'anàlisi de mutacions de significat incert en aquest gen del genoma intentant dilucidar la seva patogenicitat,²⁵⁶ de manera que l'estudi de variants potencialment patogèniques a la TTN serà més fàcil en un futur.

A més, realitzar estudis moleculars de l'impacte de les VUS sobre les proteïnes resultarà en poc temps essencial, analitzant també les *missense* quan sigui possible; ja que s'ha descrit que un 30% de les mutacions reportades com a patogèniques resulten ser polimorfismes.²⁵⁷ Per poder dur a terme això, també caldrà fer estudis d'expressió dels gens d'interès dels teixits més accessibles. L'estudi en teixit muscular resulta més senzill degut a l'accessibilitat de realitzar una biòpsia muscular, però el problema sorgirà en l'estudi de gens d'expressió a sistema nerviós. En alguns casos, es podrà buscar un teixit amb expressió semblant com els fibroblasts, però no sempre serà així.

Casos negatius i limitacions de les tècniques

Finalment, romanen 14 casos sense diagnòstic. Discutir les possibles causes per les quals no s'ha trobat la causa, pot ajudar a decidir els pròxims passos cap al diagnòstic.

La principal causa del no diagnòstic són les limitacions pròpies de les tècniques de NGS. Aquestes, no són capaces de detectar mutacions *deep intronic*, expansió de repeticions, translocacions, variació en el número de còpies (CNV) o duplicacions. Tot i que pels CNVs s'estan implementant *pipelines* que permetin la seva detecció,²⁵⁸ de moment, són precisades moltes altres tècniques com l'aCGH, el MLPA, seqüenciació Sanger tradicional... Pel que en cas de tenir un gen candidat molt clar, seria plausible el diagnòstic aplicant alguna d'aquestes tècniques.

Repasant el llistat de casos negatius, la majoria corresponen a fenotips complexos parcialment definits, al que se li podrien identificar diversos gens, pel que calen més estudis clínics per definir les proves complementàries.

A més, ha estat descrit que, de mitja, un individu és portador de 20 variants que causen la pèrdua de funció de proteïnes i que quan són heretades amb una segona mutació a l'altre al·lel poden ser causants de patologia.²⁵⁹ De fet, existeixen pacients que presenten fenotips complexos com a resultat de la coincidència de dos trastorns genètics

autosòmics recessius diferenciats, que poden empitjorar el fenotip o millorar-lo.^{260,261} Pel que durant l'anàlisi de les dades de NGS de casos complexos no s'ha de descartar la possibilitat de trobar variants que afectin dos gens diferents.

Perspectives de futur

Amb tota aquesta base, el futur del diagnòstic genètic en els trastorns neuromusculars passa per una banda, en seguir millorant les tècniques de NGS i el seu anàlisi i per l'altra, seguir ampliant el coneixement clínic.

De fet, en aquests últims anys han millorat molt les especificacions tècniques de l'NGS (millora en cobertures, rapidesa, aplicació de pipelines...) i a la vegada, els seus costos s'han reduït molt.²⁶² És per això que amb aquestes millores, acabarà sent més rentable aplicar WES en comptes dels panells ja que per un preu semblant les variants no es reduiran només als gens candidats ja associats a la patologia permetent reanàlisis en nous gens a partir dels mateixos resultats crus. Però també resulta molt necessari que els panells comercials com el TSO actualitzin el seu llistat de gens mantenint els preus competitius ja que com s'ha demostrat pels trastorns NMD ben fenotipats el rendiment de diagnòstic del TSO és molt alt. De fet, Illumina ja ha tret al mercat el panell TSO expandit que passa de cobrir 4.813 gens a més de 6.700.

Tot i la identificació amb èxit de tants gens relacionats amb els NMD, encara queden molts més per descobrir ja que es calcula que aproximadament el 40% dels pacients encara no té diagnòstic. Pel que aquestes famílies segueixen a les fosques ja que no saben què està causant la malaltia en la seva família; poden no conèixer el patró d'herència de la malaltia; poden tenir informació inexacta sobre el possible risc de recurrència per a futurs embarassos i les seves opcions de tenir un fill sa són incertes.⁴⁶ Pel que és necessària l'aplicació en recerca de les tècniques de NGS més noves, WES, WGS i RNASeq i amb la seva integració conèixer nous gens causals.

Amb els ràpids avenços tecnològics i la caiguda dels costos de la seqüenciació a gran escala, només és qüestió de temps que la seqüenciació de tot el genoma (WGS) es converteixi en una part integrant del treball clínic rutinari. Actualment, les grans bases de dades internacionals recopilen dades de diferents grups ètnics amb l'objectiu de proporcionar freqüències al·lèliques per a tots els al·lèls dins de diferents poblacions. La

integració de WGS amb dades d'expressió gènica del mateix individu (per mitjà de RNASeq) permetrà la interpretació de variants que resideixen en regions reguladores del genoma. L'RNASeq és una tècnica de NGS que permet la seqüenciació i quantificació del contingut del transcriptoma del teixit afecte del pacient. Com que el múscul és un teixit relativament fàcil d'accedir, els trastorns musculars són els primers candidats per aquest enfocament.⁴⁷ De fet, una primera aproximació seria provar si amb l'RNASeq s'aconsegueix incrementar la taxa d'èxit dels diagnòstics dels NMD. De cara al diagnòstic d'alguns d'ells però, la disponibilitat de teixit és un factor limitant ja que en els NMD causats per defectes en la motoneurona resulta impossible obtenir-ne una mostra. Actualment, la neurogenètica molecular diagnòstica se centra a identificar les mutacions causants en un pacient. En el futur, l'enfocament pot passar a la prevenció, identificant els portadors de malalties recessives abans que afectin els infants.

La investigació futura segurament se centrarà, per tant, en:

- Desenvolupar unes tècniques diagnòstiques millorades.
- Posar aquestes tècniques a mà dels serveis sanitaris de forma que es pugui prevenir l'aparició d'aquestes patologies.
- Aprofundir en el coneixement de la fisiopatologia dels NMD, fet que resultarà essencial pels fenotips complexos.
- Desenvolupar teràpies efectives per cada malaltia, gen o mutació específica.
- Determinar modificadors que alteren la severitat de les patologies fent-les variables en la penetrància i l'edat d'inici.

Resum de la importància del diagnòstic genètic i de les aproximacions terapèutiques en les NMD pediàtriques

En un moment on els trastorns neuromusculars pediàtrics no tenen una cura definitiva és essencial treballar en totes les aproximacions possibles per afavorir la qualitat de vida d'aquests pacients. Això passa per proporcionar un diagnòstic genètic el més ràpid possible per tal de que les famílies obtinguin respostes, no només sobre la causa, si no sobre l'evolució aproximada de la patologia i assessorament genètic en cas de futures gestacions.

Conèixer les causes genètiques de les patologies dels pacients amb NMD, juntament amb aprofundir en l'estudi de variants en zones reguladores de les que actualment se'n desconeix l'impacte, ajudarà a definir possibles teràpies específiques a nivell de gen o de mutació

Aquest treball ha intentat aportar un granet de sorra a tot el que queda per avançar en el futur dels trastorns neuromusculars pediàtrics.



CONCLUSIONS

1. De l'anàlisi dels efectes del 17 β -Estradiol sobre el múscul esquelètic del model murí deficient en distrofina:

- I. El tractament amb E2 aconsegueix reduir els nivells del marcador de dany muscular, creatina quinasa. No obstant, no s'observen canvis histològics per tractar-se d'un tractament a curt termini. A més, s'observa una disminució de les acumulacions de calci intracel·lular indicant un efecte estabilitzador de membrana sarcoplasmàtica. També pot ser que tingui aquest efecte promovent la sobreexpressió d'utrofina.
- II. L'administració d'E2 en el ratolins deficients en distrofina augmenta la sobreexpressió de gens relacionats amb la via de PI3K/Akt i promou la supervivència cel·lular. El receptor ER α és un dels elements que intervé en aquesta acció.
- III. El receptor p75 és un dels gens que es troba més sobreexpressat, i que no s'ha pogut determinar quin lligand està actuant sobre p75^{NTR}, però es postula que es tracta de NGF. Es creu que el cicle de generació i degradació d'aquesta neurotrofina és molt ràpid degut a la sobreexpressió de MMP-9, metal·loproteasa que degrada la forma madura de NGF.
- IV. L'augment de l'expressió dels marcadors Pax7, p75^{NTR} i MMP-9 recolzen la informació prèvia de que l'E2 està actuant sobre les poblacions de cèl·lules.
- V. L'ús dels tests funcionals ens aporta informació útil per avaluar el rendiment físic dels ratolins *mdx*, però a més, l'exercici potencia els efectes de l'E2, però alhora, pot emascarar conseqüències per l'augment dels cicles de necrosi-regeneració.
- VI. La modulació directa del receptor de neurotrofines p75^{NTR}, per mitjà del fàrmac LM11A-31, no aconsegueix els mateixos efectes que l'E2, tot i que produeix una reducció dels nivells de CKs i una millora funcional durant el pic màxim de necrosi-regeneració.

2. De l'anàlisi de l'ús del fàrmac amb activitat read-through, PTC124, i de l'ús de nanopartícules per millorar l'alliberament a múscul:

- I. No s'ha observat variació en els nivells de distrofina per l'acció del fàrmac PTC124, a la dosi i durada del tractament intraperitoneal. S'ha demostrat un augment de l'expressió en els animals tractats amb DMSO. Futurs estudis podrien determinar per quin mecanisme es produeix aquesta sobreexpressió.
- II. Les MSNs tenen tropisme per les zones inflamades, els músculs més afectes, però s'acumulen molt ràpid en els òrgans d'eliminació del fàrmac i del sistema mononuclear fagocític.
- III. L'addició de molècules PEG a la superfície de les MSNs (MSNsPEG) produeix una reducció de l'acumulació a òrgans d'eliminació del fàrmac, a la vegada que es manté el tropisme per les zones inflamades. Això fa d'aquestes nanopartícules un bon vehicle per l'alliberament de fàrmacs a múscul esquelètic amb processos d'inflamació.
- IV. El tractament amb MSNsPEG carregades amb PTC124 tampoc causa un augment de la proteïna distrofina per acció del fàrmac.

3. De l'ús de tècniques de NGS per millorar el diagnòstic genètic:

- I. L'ús de l'exoma clínic ofereix un rendiment diagnòstic més alt que les primeres versions de l'exoma complet.
- II. El reanàlisi de les dades mitjançant l'aplicació d'altres *pipelines*, el filtratge per nous gens candidats o l'ús de *software* com l'IGV, és essencial pels casos negatius en un primer terme.
- III. La validació funcional de les variants considerades de significat incert (VUS) és necessària per la confirmació dels diagnòstics.
- IV. El rendiment diagnòstic d'aquestes tècniques depèn i precisa del diagnòstic clínic previ mitjançant les dades clíniques, l'electromiografia, la biòpsia muscular i la ressonància magnètica muscular. Com més clar sigui aquest diagnòstic previ, més possibilitats hi ha de trobar la causa genètica aplicant aquestes tècniques.

BIBLIOGRAFIA

1. Frontera, W. R. & Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif. Tissue Int.* **96**, 183–195 (2015).
2. Wolfe, R. R. The underappreciated role of muscle in health and disease 1 & 3. 475–482 (2006).
3. Greising, S. M., Gransee, H. M., Mantilla, C. B. & Sieck, G. C. Systems biology of skeletal muscle: fiber type as an organizing principle. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **4**, 1–26 (2013).
4. Ottenheijm, C. A. C. & Granzier, H. Lifting the Nebula: Novel Insights into Skeletal Muscle Contractility. *Physiology* **25**, 304–310 (2010).
5. Herzog, W. The multiple roles of titin in muscle contraction and force production. *Biophys. Rev.* (2018). doi:10.1007/s12551-017-0395-y
6. Trovato, F. M., Imbesi, R., Conway, N. & Castrogiovanni, P. Morphological and Functional Aspects of Human Skeletal Muscle. 289–302 doi:10.3390/jfmk1030289
7. Lamboley, C. R., Murphy, R. M., Mckenna, M. J. & Lamb, G. D. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *J. Physiol.* **592**, 1381–1395 (2014).
8. Jayasinghe, I. D. & Launikonis, B. S. Three-dimensional reconstruction and analysis of the tubular system of vertebrate skeletal muscle. *J. Cell Sci.* **126**, 4048–4058 (2013).
9. Sweeney, HL; Hammers, D. Muscle contraction. *s Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, 1 (2018).
10. Scott, W; Stevens, J; Binder-Macleod, S. Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Phys. Ther.* **81**, 1810–1816 (2001).
11. Zierath, J. R. & Hawley, J. A. Skeletal muscle fiber type: Influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biol.* **2**, (2004).
12. Ciciliot, S. & Schiaffino, S. Regeneration of Mammalian Skeletal Muscle: Basic Mechanisms and Clinical Implications. 906–914 (2010).
13. Charge, S. B. P. & Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* **84**, 209 (2004).
14. Musarò, A. The Basis of Muscle Regeneration. **2014**, (2014).
15. Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 493–495 (1961).
16. Hawke, TJ; Garry, D. Myogenic satellite cells: Physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* **91**, 534–551 (2001).
17. Almeida, C. F., Fernandes, S. A., Ribeiro Junior, A. F., Keith Okamoto, O. & Vainzof, M. Muscle satellite cells: Exploring the basic biology to rule them. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
18. Murach, K. A. *et al.* Starring or Supporting Role? Satellite Cells and Skeletal Muscle Fiber Size Regulation. *Physiology* **33**, 26–38 (2018).
19. Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A. & Kardon, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* **138**, 3625–3637 (2011).
20. McClung, J. M., Davis, J. M., Wilson, M. A., Goldsmith, E. C. & Carson, J. A. Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *J. Appl. Physiol.* **100**, 2012–2023 (2006).
21. Spangenburg, EE; Geiger, PC; Leinwand, LA; Lowe, D. Regulation of physiological and metabolic function of muscle by female sex steroids. *Med Sci Sport. Exerc* **44**,

- 1653–1662 (2012).
22. White, J. P. *et al.* Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a Signaling in Skeletal Muscle. *Mol Cell Endocrinol* **365**, 174–186 (2013).
 23. Carson, James A; Manolagas, S. Effects of sex steroids on bones and muscles: similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone* **80**, 67–78 (2015).
 24. KERKSICK, C., TAYLOR, L., HARVEY, A. & WILLOUGHBY, D. Gender-Related Differences in Muscle Injury, Oxidative Stress, and Apoptosis. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **40**, 1772–1780 (2008).
 25. Stupka, N. *et al.* Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J. Appl. Physiol.* **89**, 2325–2332 (2000).
 26. Macneil, L. G., Baker, S. K., Stevic, I. & Tarnopolsky, M. A. 17 β -estradiol attenuates exercise-induced neutrophil infiltration in men. 1443–1451 (2018). doi:10.1152/ajpregu.00689.2009.
 27. Kuoppasalmi, K., Näveri, H., Rehunen, S., Härkönen, M. & Adlercreutz, H. Effect of strenuous anaerobic running exercise on plasma growth hormone, cortisol, luteinizing hormone, testosterone, androstenedione, estrone and estradiol. *J. Steroid Biochem.* **7**, 823–829 (1976).
 28. Conceição, M. S. *et al.* Effects of eccentric exercise on systemic concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines and prostaglandin (E2): Comparison between young and postmenopausal women. *Eur. J. Appl. Physiol.* **112**, 3205–3213 (2012).
 29. Bär, PR; Amelink, GJ; Oldenburg, B; Blankenstein, M. Prevention of exercise-induced muscle membrane damage by oestradiol. *Life Sci.* **42**, 2677–2681 (1988).
 30. Enns, D. L. & Tiidus, P. M. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J. Appl. Physiol.* **115**, 4691–4705 (2013).
 31. Tiidus, P. M. & Bombardier, E. Oestrogen attenuates post-exercise myeloperoxidase activity in skeletal muscle of male rats. *Acta Physiol. Scand.* **166**, 85–90 (1999).
 32. St. Pierre Schneider, B., Correia, L. A. & Cannon, J. G. Sex differences in leukocyte invasion in injured murine skeletal muscle. *Res. Nurs. Heal.* **22**, 243–250 (1999).
 33. Enns, D. L. & Tiidus, P. M. The influence of estrogen on skeletal muscle: Sex matters. *Sport. Med.* **40**, 41–58 (2010).
 34. Roth, S. M. *et al.* Skeletal muscle satellite cell characteristics in young and older men and women after heavy resistance strength training. *Journals Gerontol. Ser. a-Biological Sci. Med. Sci.* **56**, B240–B247 (2001).
 35. Salimena, M. C., Lagrota-Candido, J. & Quírico-Santos, T. Gender dimorphism influences extracellular matrix expression and regeneration of muscular tissue in mdx dystrophic mice. *Histochem. Cell Biol.* **122**, 435–444 (2004).
 36. Enns, D. L., Iqbal, S. & Tiidus, P. M. Oestrogen receptors mediate oestrogen-induced increases in post-exercise rat skeletal muscle satellite cells. *Acta Physiol.* **194**, 81–93 (2008).
 37. Galluzzo, P. *et al.* 17 β -Estradiol regulates the first steps of skeletal muscle cell differentiation via ER- α -mediated signals. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **297**, C1249–62 (2009).
 38. Haizlip, K. M., Harrison, B. C. & Leinwand, L. A. Sex-Based Differences in Skeletal

- Muscle Kinetics and Fiber-Type Composition. *Physiology* **30**, 30–39 (2015).
39. Todd, E. J. *et al.* Next generation sequencing in a large cohort of patients presenting with neuromuscular disease before or at birth. *Orphanet J. Rare Dis.* **10**, 1–14 (2015).
 40. Greenberg, S. A. & Walsh, R. J. Molecular diagnosis of inheritable neuromuscular disorders. Part II: Application of genetic testing in neuromuscular disease. *Muscle Nerve* **31**, 431–451 (2005).
 41. Zatz, M., Passos-Bueno, M. R. & Vainzof, M. Neuromuscular disorders: Genes, genetic counseling and therapeutic trials. *Genet. Mol. Biol.* **39**, 339–348 (2016).
 42. Malfatti, E. & Romero, N. B. *Diseases of the skeletal muscle. Handbook of Clinical Neurology* **145**, (Elsevier B.V., 2017).
 43. Mary, P., Servais, L. & Vialle, R. Neuromuscular diseases: Diagnosis and management. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* **104**, S89–S95 (2018).
 44. Bonne, G., Rivier, F. & Hamroun, D. The 2018 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul. Disord.* **27**, 1152–1183 (2017).
 45. Mercuri, E. *et al.* Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: Past, present, and future. *J. Magn. Reson. Imaging* **25**, 433–440 (2007).
 46. Lang, N. G. Genetics of Neuromuscular Disorders. *Neuromuscul. Disord. Infancy, Childhood, Adolesc. A Clin. Approach* **49**, 17–31 (2014).
 47. Schuelke, M. Myopathology in the times of modern genetics. *ARPN J. Eng. Appl. Sci.* **12**, 3218–3221 (2017).
 48. Nigro, V. & Savarese, M. Next-generation sequencing approaches for the diagnosis of skeletal muscle disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **29**, 621–627 (2016).
 49. Miyatake, S; Shimizu-Motohashi, Y; Takeda, S & Aoki, Y. Anti-inflammatory drugs for Duchenne muscular dystrophy: focus on skeletal muscle-releasing factors. *Drug Des. Devel. Ther.* **10**, 2745–2758 (2016).
 50. Flanigan, K. M. Duchenne and becker muscular dystrophies. *Neurol. Clin.* **32**, 671–688 (2014).
 51. Shieh, P. B. Muscular Dystrophies and Other Genetic Myopathies. *Neurol. Clin.* **31**, 1009–1029 (2013).
 52. Bushby, K. M. D. & Anderson, L. V. B. Muscular Dystrophy.
 53. Bushby, K. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* **9**, 77–93 (2010).
 54. Annexstad, EJ; Lund-Petersen, I & Rasmussen, M. Duchenne muscular dystrophy. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1361–1364 (2014). doi:10.5435/00124635-200203000-00009
 55. Yiu, E. M. & Kornberg, A. J. Duchenne muscular dystrophy. *J. Paediatr. Child Health* **51**, 759–764 (2015).
 56. Le Rumeur, E. & Rumeur, E. Le. Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **15**, 14–20 (2015).
 57. Gao, Q. & McNally, E. M. The Dystrophin Complex: structure, function and implications for therapy. *Science (80-.)*. **352**, 1223–1239 (2016).
 58. Pilgram, G. S. K., Potikanond, S., Baines, R. A., Fradkin, L. G. & Noordermeer, J. N. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Mol.*

- Neurobiol.* **41**, 1–21 (2010).
59. Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E. & Davies, K. E. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiol. Rev.* **82**, 291–329 (2002).
 60. Perkins, K. J. & Davies, K. E. The role of utrophin in the potential therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **12**, 17–20 (2002).
 61. Allen, D. G. & Whitehead, N. P. Duchenne muscular dystrophy - What causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 290–294 (2011).
 62. Allen, D. G., Gervasio, O. L., Yeung, E. W. & Whitehead, N. P. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy This article is one of a selection of papers published in this special issue on Calcium Signaling. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**, 83–91 (2010).
 63. Vallejo-Illarramendi, A., Toral-Ojeda, I., Aldanondo, G. & López de Munain, A. Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Rev. Mol. Med.* **16**, e16 (2014).
 64. Allen, D. G., Whitehead, N. P., Froehner, S. C. & Al, A. E. T. ABSENCE OF DYSTROPHIN DISRUPTS SKELETAL MUSCLE SIGNALING: ROLES OF Ca^{2+} , REACTIVE OXYGEN SPECIES, AND NITRIC OXIDE IN THE DEVELOPMENT OF MUSCULAR DYSTROPHY. 253–305 (2016). doi:10.1152/physrev.00007.2015
 65. Kharraz, Y., Guerra, J., Pessina, P., Serrano, A. L. & Muñoz-Cánoves, P. Understanding the process of fibrosis in duchenne muscular dystrophy. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
 66. Nakamura, A. & Takeda, S. Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: Pathological characteristics and therapeutic applications. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, (2011).
 67. Wilson, K. *et al.* Duchenne and Becker Muscular Dystrophies: A Review of Animal Models, Clinical End Points, and Biomarker Quantification. *Toxicol. Pathol.* **45**, 961–976 (2017).
 68. Kalra, S., Montanaro, F. & Denning, C. Can Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Advance Understanding of Muscular Dystrophies? *J. Neuromuscul. Dis.* **3**, 309–332 (2016).
 69. Collins, C. A. & Morgan, J. E. Duchenne’s muscular dystrophy: Animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int. J. Exp. Pathol.* **84**, 165–172 (2003).
 70. Berger, J. & Currie, P. D. Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies. *Dis. Model. Mech.* **5**, 726–732 (2012).
 71. Gaud, A. *et al.* Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 365–370 (2004).
 72. Pantoja, M. & Ruohola-Baker, H. *Drosophila* as a starting point for developing therapeutics for the rare disease Duchenne Muscular Dystrophy. *Rare Dis.* **1**, e24995 (2013).
 73. Sicinski, P. *et al.* The Molecular Basis of Muscular Dystrophy in the mdx Mouse : A Point Mutation. **244**, 14–16 (1989).
 74. De Luca, A. *et al.* Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 453–63 (2003).

75. Lim, J. H., Kim, D. Y. & Bang, M. S. Effects of exercise and steroid on skeletal muscle apoptosis in the mdx mouse. *Muscle and Nerve* **30**, 456–462 (2004).
76. Tinsley, J. *et al.* Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat. Med.* **4**, 1441–1444 (1998).
77. Grady, R. M. *et al.* Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: A model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 729–738 (1997).
78. McGreevy, J. W., Hakim, C. H., McIntosh, M. A. & Duan, D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis. Model. Mech.* **8**, 195–213 (2015).
79. Nakamura, K. *et al.* Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci. Rep.* **4**, 1–6 (2015).
80. Shimatsu, Y. *et al.* Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). *Exp. Anim.* **52**, 93–97 (2003).
81. Selsby, J. T., Ross, J. W., Nonneman, D. & Hollinger, K. Porcine models of muscular dystrophy. *ILAR J.* **56**, 116–126 (2015).
82. Seto, JT; Bengtsson, NE; Chamberlain, J. Therapy of Genetic Disorders—Novel Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr Pediatr Rep* **2**, 102–112 (2014).
83. Robinson-Hamm, JN & Gersbach, C. Gene therapies that restore dystrophin expression for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* **135**, 87–92 (2016).
84. Crispi, V. & Matsakas, A. Duchenne muscular dystrophy: genome editing gives new hope for treatment. 1–9 (2018). doi:10.1136/postgradmedj-2017-135377
85. Chamberlain, J. R. & Chamberlain, J. S. Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* **25**, 1125–1131 (2017).
86. Dowling, J. J., D. Gonorazky, H., Cohn, R. D. & Campbell, C. Treating pediatric neuromuscular disorders: The future is now. *Am. J. Med. Genet. Part A* 1–38 (2017). doi:10.1002/ajmg.a.38418
87. Shawi, F; Perras, C & Severn, M. Emerging Drugs for Duchenne Muscular Dystrophy. *CADTH* 1–19 (2017).
88. Bladen, C. L. *et al.* The TREAT-NMD DMD global database: Analysis of more than 7,000 duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* **36**, 395–402 (2015).
89. Barton-Davis, E. R., Cordier, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E. & Sweeney, H. L. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* **104**, 375–381 (1999).
90. Gómez-Grau, M. *et al.* Evaluation of aminoglycoside and non-aminoglycoside compounds for stop-codon readthrough therapy in four lysosomal storage diseases. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
91. Rousset, J., Namy, O. & Bidou, L. Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. **18**, (2012).
92. Siddiqui, N. & Sonenberg, N. Proposing a mechanism of action for ataluren. **113**, 12353–12355 (2016).
93. Welch, E. M. *et al.* PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **447**, 87–91 (2007).
94. McElroy, S. P. *et al.* A Lack of Premature Termination Codon Read-Through Efficacy of PTC124 (Ataluren) in a Diverse Array of Reporter Assays. *PLoS Biol.* **11**, (2013).
95. McDonald, C. M. *et al.* Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind,

- placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **390**, 1489–1498 (2017).
96. DMD Makes The Cut | Biotech Primer WEEKLY. Available at: <https://weekly.biotechprimer.com/dmd-makes-the-cut/>. (Accessed: 13th June 2018)
 97. Goemans, N. M. *et al.* Systemic Administration of PRO051 in Duchenne’s Muscular Dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1513–1522 (2011).
 98. Mendell, J. R. *et al.* Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **74**, 637–647 (2013).
 99. Hagan, M., Ashraf, M., Kim, I., Weintraub, N. L. & Tang, Y. Effective regeneration of dystrophic muscle using autologous iPSC-derived progenitors with CRISPR-Cas9 mediated precise correction. *Med. Hypotheses* **110**, 97–100 (2018).
 100. Darabi, R; Arpke, RW; Irion, S; Dimos, JT; Grskovic, M; Kyba, M & Perlingero, R. Human ES- and iPSC-Derived Myogenic Progenitors Restore Dystrophin and Improve Contractility upon Transplantation in Dystrophic Mice. *Cell Stem Cell* **10**, 610–619 (2012).
 101. Okada, T. & Takeda, S. Current Challenges and Future Directions in Recombinant AAV-Mediated Gene Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy. 813–836 (2013). doi:10.3390/ph6070813
 102. Athanasopoulos, T., Graham, I. R., Foster, H. & Dickson, G. Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther.* **11**, S109–S121 (2004).
 103. Wang, B., Li, J., Fu, F. H. & Xiao, X. Systemic human minidystrophin gene transfer improves functions and life span of dystrophin and dystrophin/utrophin-deficient mice. *J. Orthop. Res.* **27**, 421–426 (2009).
 104. Shin, J. H. *et al.* Microdystrophin ameliorates muscular dystrophy in the canine model of duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* **21**, 750–757 (2013).
 105. Jerry R. Mendell, M.D., Katherine Campbell, B.S., Louise Rodino-Klapac, Ph.D., Zarife Sahenk, M.D., Ph.D., Chris Shilling, M.S., Sarah Lewis, Dawn Bowles, Ph.D., Steven Gray, Ph.D., Chengwen Li, Ph.D., Gloria Galloway, M.D., Vinod Malik, Ph.D., Brian Cole, P. D. Dystrophin immunity in Duchenne’s Muscular Dystrophy. *N Engl J Med* **363**, 1429–1437 (2010).
 106. Zhu, P. *et al.* CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Corrects Dystrophin Mutation in Skeletal Muscle Stem Cells in a Mouse Model of Muscle Dystrophy. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **7**, 31–41 (2017).
 107. Nelson, C. E. *et al.* In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science (80-.)*. **351**, 403–407 (2016).
 108. Chen, Y.; Zheng, Y.; Kang, Y.; Yang, W.; Niu, Y.; Guo, X.; Tu, Z.; Si, C.; Wang, H.; Xing, R.; Pu, X.; Yang, SH.; Li, S.; Ji, W. & Li, X. Functional disruption of the dystrophin gene in Rhesus Monkey Using CRISPR/Cas9. *Hum. Mol Genet.* **2798**, 1–49 (2015).
 109. Long, C. *et al.* Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germilne DNA. *Science (80-.)*. **345**, 1184–1188 (2014).
 110. Mayer, O. H., Leinonen, M., Rummey, C., Meier, T. & Buyse, G. M. Efficacy of Idebeneone to Preserve Respiratory Function above Clinically Meaningful Thresholds for Forced Vital Capacity (FVC) in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Neuromuscul. Dis.* **4**, 189–198 (2017).
 111. Meier, T. *et al.* Idebeneone reduces respiratory complications in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **26**, 473–480 (2016).

112. Bettica, P. *et al.* Histological effects of givinostat in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **26**, 643–649 (2016).
113. Yang, Y. & Yu, C. Advances in silica based nanoparticles for targeted cancer therapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, 317–332 (2016).
114. Barreto, J. A. *et al.* Nanomaterials: Applications in cancer imaging and therapy. *Adv. Mater.* **23**, (2011).
115. Zhang, L. *et al.* Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 761–769 (2008).
116. Conde, J. *et al.* Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front. Chem.* **2**, 48 (2014).
117. Wu, S.-H., Mou, C.-Y. & Lin, H.-P. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 3862 (2013).
118. Tang, F., Li, L. & Chen, D. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Adv. Mater.* **24**, 1504–1534 (2012).
119. Rosenholm, J. M., Sahlgren, C. & Lindén, M. Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles – opportunities & challenges. *Nanoscale* **2**, 1870 (2010).
120. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951 (2015).
121. Longo, F. M. & Massa, S. M. Small Molecule Modulation of p75 Neurotrophin Receptor Functions. 63–70 (2008).
122. Shi, J.; Longo, F.M. & Massa, S. M. A Small Molecule p75 NTR Ligand Protects Neurogenesis After Traumatic Brain Injury. *Stem Cells Int.* 2561–2574 (2013). doi:10.1002/stem.1516
123. Simmons, D. A. *et al.* A Small Molecule p75 NTR Ligand , LM11A-31 , Reverses Cholinergic Neurite Dystrophy in Alzheimer ' s Disease Mouse Models with Mid- to Late-Stage Disease Progression. **9**, 1–12 (2014).
124. Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. & Ensign, L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **99**, 28–51 (2016).
125. Ramadasan-Nair, R. *et al.* Mitochondrial Alterations and Oxidative Stress in an Acute Transient Mouse Model of Muscle Degeneration. *J. Biol. Chem.* **289**, 485–509 (2014).
126. TREAT-NMD: Experimental protocols for DMD animal models. Available at: <http://www.treat-nmd.eu/research/preclinical/dmd-sops/>. (Accessed: 13th June 2018)
127. Roma, J., Munell, F., Fargas, A. & Roig, M. Evolution of pathological changes in the gastrocnemius of the mdx mice correlate with utrophin and β -dystroglycan expression. *Acta Neuropathol.* **108**, 443–452 (2004).
128. Roig, M., Roma, J., Fargas, A. & Munell, F. Longitudinal pathologic study of the gastrocnemius muscle group in mdx mice. *Acta Neuropathol.* **107**, 27–34 (2004).
129. Valentine, B. A., Cooper, B. J. & Gallagher, E. A. Intracellular calcium in canine muscle biopsies. *J. Comp. Pathol.* **100**, 223–230 (1989).
130. Cornelio, F. & Dones, I. Muscle fiber degeneration and necrosis in muscular dystrophy and other muscle diseases: Cytochemical and immunocytochemical data. *Ann. Neurol.* **16**, 694–701 (1984).
131. Hedegaard, J. *et al.* Methods for interpreting lists of affected genes obtained in a

- DNA microarray experiment. *BMC Proc.* **3**, S5 (2009).
132. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
 133. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215 (1988).
 134. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
 135. McKenna, A.; Hanna, M.; Banks, E.; Sivachenko, A.; Cibulskis, K.; Kernytzky, A.; Garimella, K.; Altshuler, D.; Gabriel, S.; Daly, M.; DePristo, M. A. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
 136. Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68–74 (2015).
 137. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016).
 138. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1062–D1067 (2018).
 139. Sherry, S. T. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 308–311 (2001).
 140. Fokkema, I. F. A. C. *et al.* LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases. *Hum. Mutat.* **32**, 557–563 (2011).
 141. Cingolani, P. *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. *Fly (Austin)*. **6**, 80–92 (2012).
 142. Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R. & Chan, A. P. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS One* **7**, e46688 (2012).
 143. Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M. & Seelow, D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* **11**, 361 (2014).
 144. Desmet, F.-O. *et al.* Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* **37**, e67–e67 (2009).
 145. Pertea, M., Lin, X. & Salzberg, S. L. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1185–1190 (2001).
 146. Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S. & Roskin, K. M. The Human Genome Browser at UCSC W. *J. Med. Chem.* **19**, 1228–31 (1976).
 147. Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* **14**, 178–192 (2013).
 148. Jennings, L. J. & Kirschmann, D. Genetic Testing Requires NGS and Sanger Methodologies. *Pediatr. Neurol. briefs* **30**, 36 (2016).
 149. Koressaar, T. & Remm, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**, 1289–1291 (2007).
 150. Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134 (2012).
 151. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**, 95–98 (1999).
 152. Nagaraju, K., Gordish, H., Carlson, G. & De Luca, A. Serum Creatine Kinase analysis in mouse models of muscular dystrophy. (2008).
 153. Page-McCaw, A., Ewald, A. J. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the

- regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 221–233 (2007).
154. Grünberg, J. R. *et al.* CCN5 / WISP2 and metabolic diseases. *J. Cell Commun. Signal.* **12**, 309–318 (2018).
 155. Dixon, A. K. *et al.* Expression of the Dystrophin-related protein 2 (Drp2) transcript in the mouse. *J. Mol. Biol.* **270**, 551–558 (1997).
 156. He, Q., Zhang, Z., Gao, F., Li, Y. & Shi, J. In vivo biodistribution and urinary excretion of mesoporous silica nanoparticles: Effects of particle size and PEGylation. *Small* **7**, 271–280 (2011).
 157. Pigozzo, S. R. *et al.* Revertant Fibers in the mdx Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy: An Age- and Muscle-Related Reappraisal. *PLoS One* **8**, (2013).
 158. Bitoun, M. *et al.* Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Ann. Neurol.* **62**, 666–670 (2007).
 159. Forissier, J. E. *et al.* [Apical left ventricular aneurysm without atrio-ventricular block due to a lamin A/C gene mutation]. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* **98**, 67–70 (2005).
 160. Malfatti, E. *et al.* Muscle histopathology in nebulin-related nemaline myopathy: Ultrastructural findings correlated to disease severity and genotype. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, (2014).
 161. Laporte, J. Mutations in the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. ENMC International Consortium on Myotubular Myopathy. European Neuro- Muscular Center. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1505–1511 (1997).
 162. Mihaylova, V. *et al.* Molecular characterisation of congenital myasthenic syndromes in Southern Brazil. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **81**, 973–977 (2010).
 163. Kossugue, P. M. *et al.* Central core disease due to recessive mutations in RYR1 gene: Is it more common than described? *Muscle and Nerve* **35**, 670–674 (2007).
 164. White, S. J. *et al.* Sarcoglycanopathies and the risk of undetected deletion alleles in diagnosis. *Hum. Mutat.* **26**, 59 (2005).
 165. Jungbluth, H.; Zhou, H.; Hartley, L.; Halliger-Keller, B.; Messina, S.; Longman, C.; Brockington, M.; Robb, S.A.; Straub, V.; Voit, T.; Swash, M.; Ferreira, A.; Bydder, G.; Sewry, C.A.; Müller, C.; Muntoni, F. Minicore myopathy with ophthalmoplegia caused by mutations in the ryanodine receptor type 1 gene. *Neurology* **65**, 1930–1935 (2005).
 166. Nascimbeni, A. C., Fanin, M., Tasca, E. & Angelini, C. Transcriptional and translational effects of intronic CAPN3 gene mutations. *Hum. Mutat.* **31**, 1658–1669 (2010).
 167. Larionov, A. A. *et al.* Aromatase in skeletal muscle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **84**, 485–492 (2003).
 168. Roberts, R.G.; Freeman, T.C.; Kendall, E.; Vetrie, D.L.P.; Dixon, A.K.; Shaw-Smith, C.; Bone, Q.; Bobrow, M. Characterization of DRP2, a novel human dystrophin homologue. *Nat Genet.* **13**, 353–6 (1996).
 169. Rivier, F. *et al.* Utrophin and dystrophin-associated glycoproteins in normal and dystrophin deficient cardiac muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **20**, 305–314 (1999).
 170. Jeong, D. *et al.* Matricellular Protein CCN5 reverses established cardiac fibrosis. *J. Am. Coll. Cardiol* **67**, 1556–1568 (2016).
 171. Smith, L. R. & Barton, E. R. Regulation of fibrosis in muscular dystrophy. *Matrix Biol.* (2018). doi:10.1016/j.matbio.2018.01.014
 172. Dhar, K., Banerjee, S., Dhar, G., Sengupta, K. & Banerjee, S. K. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induces WISP-2/CCN5 via multiple molecular cross-talks and is

- essential for mitogenic switch by IGF-1 axis in estrogen receptor-positive breast tumor cells. *Cancer Res.* **67**, 1520–1526 (2007).
173. Stitt, T. N. *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell* **14**, 395–403 (2004).
 174. Sanes, J. R. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **278**, 12601–12604 (2003).
 175. Fukushima, K. *et al.* Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC Musculoskelet. Disord.* **8**, 1–11 (2007).
 176. Nadarajah, V. D. *et al.* Serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a biomarker for monitoring disease progression in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Neuromuscul. Disord.* **21**, 569–578 (2011).
 177. Shiba, N. *et al.* Differential roles of MMP-9 in early and late stages of dystrophic muscles in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1852**, 2170–2182 (2015).
 178. Dahiya, S. *et al.* Elevated levels of active matrix metalloproteinase-9 cause hypertrophy in skeletal muscle of normal and dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 4345–4359 (2011).
 179. Li, H., Mittal, A., Makonchuk, D. Y., Bhatnagar, S. & Kumar, A. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2584–2598 (2009).
 180. Haslett, J. N. *et al.* The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. *Mamm. Genome* **16**, 739–748 (2005).
 181. Petrof, B. J. *et al.* Adaptations in myosin heavy chain expression and contractile function in dystrophic mouse diaphragm. *Am. J. Physiol.* **265**, C834–41 (1993).
 182. Baltgalvis, K. A., Greising, S. M., Warren, G. L. & Lowe, D. A. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS One* **5**, (2010).
 183. Enns, D. L. & Tiidus, P. M. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J. Appl. Physiol.* **104**, 347–353 (2008).
 184. Thomas, A., Bunyan, K. & Tiidus, P. M. Oestrogen receptor-alpha activation augments post-exercise myoblast proliferation. *Acta Physiol.* **198**, 81–89 (2010).
 185. Brown, M., Ning, J., Ferreira, J. A., Bogener, J. L. & Lubahn, D. B. Estrogen receptor- and - and aromatase knockout effects on lower limb muscle mass and contractile function in female mice. *AJP Endocrinol. Metab.* **296**, E854–E861 (2009).
 186. Velders, M., Schleipen, B., Fritzemeier, K. H., Zierau, O. & Diel, P. Selective estrogen receptor- β activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FASEB J.* **26**, 1909–20 (2012).
 187. Mourkioti, F. & Rosenthal, N. IGF-1, inflammation and stem cells: Interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol.* **26**, 535–542 (2005).
 188. Barton, E. R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N. & Lee Sweeney, H. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J. Cell Biol.* **157**, 137–147 (2002).
 189. Mangan, G., Bombardier, E., Mitchell, A. S., Quadrilatero, J. & Tiidus, P. M.

- Oestrogen-dependent satellite cell activation and proliferation following a running exercise occurs via the PI3K signalling pathway and not IGF-1. *Acta Physiol.* **212**, 75–85 (2014).
190. Glass, D. J. PI3 Kinase Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Life Sci. J.* **6**, 23–27 (2009).
 191. Cheng, S. M. *et al.* Exercise training enhances cardiac IGFI-R/PI3K/Akt and Bcl-2 family associated pro-survival pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Cardiol.* **167**, 478–485 (2013).
 192. Zammit, P. S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **72**, 19–32 (2017).
 193. Rodriguez, J. *et al.* Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4361–4371 (2014).
 194. Wagner, K. R., McPherron, A. C., Winik, N. & Lee, S. J. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann. Neurol.* **52**, 832–836 (2002).
 195. Mousavi, K.; Jasmin, B. J. BDNF Is Expressed in Skeletal Muscle Satellite Cells and Inhibits Myogenic Differentiation. *J. Neurosci.* **26**, 5739–5749 (2006).
 196. Baron, P. *et al.* Expression of the low-affinity NGF receptor during human muscle development, regeneration, and in tissue culture. *Muscle Nerve* **17**, 276–84 (1994).
 197. Sakuma, K. & Yamaguchi, A. The recent understanding of the neurotrophin's role in skeletal muscle adaptation. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, (2011).
 198. Bibel, M. & Barde, Y. A. Neurotrophins: Key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* **14**, 2919–2937 (2000).
 199. Hempstead, B. L. The many faces of p75NTR. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**, 260–267 (2002).
 200. Roux, P. P. & Barker, P. A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* **67**, 203–233 (2002).
 201. Schor, N. F. The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog. Neurobiol.* **77**, 201–214 (2005).
 202. Deponti, D.; Buono, R.; Catanzaro, G.; De Palma, C.; Longhi, R.; Meneveri, R.; Bresolin, N.; Bassi, MT.; Cossu, G.; Clementi, E.; Brunelli, S. The low-affinity receptor for neurotrophins p75NTR plays a key role for satellite cell function in muscle repair acting via RhoA. *Mol. Biol. Cell* **21**, 4042–4056 (2009).
 203. Sasi, S. P. *et al.* Genetic deletion of TNFR2 augments inflammatory response and blunts satellite-cell-mediated recovery response in a hind limb ischemia model. *FASEB J.* **29**, 1208–1219 (2015).
 204. Colombo, E. *et al.* Autocrine and immune cell-derived BDNF in human skeletal muscle: Implications for myogenesis and tissue regeneration. *J. Pathol.* **231**, 190–198 (2013).
 205. Nico, B. *et al.* Nerve growth factor and its receptors TrkA and p75 are upregulated in the brain of mdx dystrophic mouse. *Neuroscience* **161**, 1057–1066 (2009).
 206. Hicks, M. R. *et al.* ERBB3 and NGFR mark a distinct skeletal muscle progenitor cell in human development and hPSCs. *Nat. Cell Biol.* **20**, 46–57 (2018).
 207. Kreft, L. *et al.* ConTra v3: A tool to identify transcription factor binding sites across species, update 2017. *Nucleic Acids Res.* **45**, W490–W494 (2017).
 208. Toschi, G.; Dore, E.; Angeletti, P.U.; Levi-Montalcini, R.; De Haën, C. Characteristics of labelled RNA from spinal ganglia of chick embryo and the action of a specific

- growth factor (NGF). *J. Neurochem.* **13**, 539–544 (1966).
209. Arévalo, J. C. & Wu, S. H. Neurotrophin signaling: Many exciting surprises! *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1523–1537 (2006).
 210. Lavasani, M., Lu, A., Peng, H., Cummins, J. & Huard, J. Nerve growth factor improves the muscle regeneration capacity of muscle stem cells in dystrophic muscle. *Hum. Gene Ther.* **17**, 180–192 (2006).
 211. Capsoni, S., Ruberti, F., Di Daniel, E. & Cattaneo, A. Muscular dystrophy in adult and aged anti-NGF transgenic mice resembles an inclusion body myopathy. *J. Neurosci. Res.* **59**, 553–560 (2000).
 212. Ruberti, F. *et al.* Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J. Neurosci.* **20**, 2589–601 (2000).
 213. Clow, C.; Jasmin, B. J. Brain-derived Neurotrophic Factor Regulates Satellite Cell Differentiation and Skeltal Muscle Regeneration. *Mol. Biol. Cell* **21**, 2182–2190 (2010).
 214. Roux, P. P., Bhakar, A. L., Kennedy, T. E. & Barker, P. A. The p75 Neurotrophin Receptor Activates Akt (Protein Kinase B) through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 23097–23104 (2001).
 215. Kao, T. H., Peng, Y. J., Salter, D. M. & Lee, H. S. Nerve growth factor increases MMP9 activity in annulus fibrosus cells by upregulating lipocalin 2 expression. *Eur. Spine J.* **24**, 1959–1968 (2015).
 216. Toti, P. *et al.* Nerve growth factor expression in human dystrophic muscles. *Muscle Nerve* **27**, 370–373 (2003).
 217. Colombo, E. *et al.* The neurotrophin receptor p75NTR is induced on mature myofibres in inflammatory myopathies and promotes myotube survival to inflammatory stress. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **38**, 367–378 (2012).
 218. Usuki, F., Nakazato, O., Osame, M. & Igata, A. [Hyperestrogenemia in Duchenne muscular dystrophy (DMD)]. *Rinsho Shinkeigaku* **25**, 711–5 (1985).
 219. Kherif, S. *et al.* Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Regenerating Skeletal Muscle: A Study in Experimentally Injured andmdxMuscles. *Dev. Biol.* **205**, 158–170 (1999).
 220. Komm, B. S. & Mirkin, S. An overview of current and emerging SERMs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **143**, 207–222 (2014).
 221. Dorchies, O. M. *et al.* The anticancer drug tamoxifen counteracts the pathology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* **182**, 485–504 (2013).
 222. Shah, V. P. *et al.* Tamoxifen promotes superoxide production in platelets by activation of PI3-Kinase and NADPH oxidase pathways. *Thromb. Res.* **129**, 36–42 (2012).
 223. Mchugh, D. R. *et al.* A G542X cystic fibrosis mouse model for examining nonsense mutation directed therapies. 1–14 (2018).
 224. Auld, D. S., Thorne, N., Maguire, W. F. & Inglese, J. Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3585–3590 (2009).
 225. Harmer, S. C., Mohal, J. S., Kemp, D. & Tinker, A. Readthrough of long-QT syndrome type 1 nonsense mutations rescues function but alters the biophysical properties of the channel. *Biochem. J.* **443**, 635–642 (2012).

226. Dranchak, P. K. *et al.* Nonsense suppressor therapies rescue peroxisome lipid metabolism and assembly in cells from patients with specific PEX gene mutations. *J. Cell. Biochem.* **112**, 1250–1258 (2011).
227. Bolze, F., Mocek, S., Zimmermann, A. & Klingenspor, M. Aminoglycosides, but not PTC124 (Ataluren), rescue nonsense mutations in the leptin receptor and in luciferase reporter genes. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
228. Sarkar, C., Zhang, Z. & Mukherjee, A. B. Stop codon read-through with PTC124 induces palmitoyl-protein thioesterase-1 activity, reduces thioester load and suppresses apoptosis in cultured cells from INCL patients. *Mol. Genet. Metab.* **104**, 338–345 (2011).
229. Bezzerri, V. *et al.* Ataluren-driven restoration of Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein function in Shwachman-Diamond syndrome bone marrow cells. *Am. J. Hematol.* **93**, 527–536 (2018).
230. Li, M., Andersson-Lendahl, M., Sejersen, T. & Arner, A. Muscle dysfunction and structural defects of dystrophin-null sapje mutant zebrafish larvae are rescued by ataluren treatment. *FASEB J.* **28**, 1593–1599 (2014).
231. Roy, B. *et al.* Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 12508–12513 (2016).
232. Vignaud, A., Cebrian, J., Martelly, I., Caruelle, J. P. & Ferry, A. Effect of anti-inflammatory and antioxidant drugs on the long-term repair of severely injured mouse skeletal muscle. *Exp. Physiol.* **90**, 487–495 (2005).
233. Silveira, P. C. L. *et al.* Effects of Therapeutic Pulsed Ultrasound and Dimethylsulfoxide (DMSO) Phonophoresis on Parameters of Oxidative Stress in Traumatized Muscle. *Ultrasound Med. Biol.* **36**, 44–50 (2010).
234. Velasco, R., Trujillo, X., Vásquez, C., Huerta, M. & Trujillo-Hernández, B. Effect of dimethyl sulfoxide on excitation-contraction coupling in chicken slow skeletal muscle. *J. Pharmacol. Sci.* **93**, 149–154 (2003).
235. Nishimura, M. *et al.* Effects of dimethyl sulphoxide and dexamethasone on mRNA expression of myogenesis- and muscle proteolytic system-related genes in mouse myoblastic C2C12 cells. *J. Biochem.* **144**, 717–724 (2008).
236. Srikuea, R. & Suhatcho, K. Impact of intramuscular administration of lipid-soluble and water-soluble vehicles into regenerating muscle at the distinct phases of skeletal muscle regeneration. *J. Physiol. Sci.* 1–15 (2017). doi:10.1007/s12576-017-0576-2
237. Beekman, C., Janson, A. A., Baghat, A., van Deutekom, J. C. & Datson, N. A. Use of capillary Western immunoassay (Wes) for quantification of dystrophin levels in skeletal muscle of healthy controls and individuals with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* **13**, 1–21 (2018).
238. Van Den Bergen, J. C. *et al.* Dystrophin levels and clinical severity in Becker muscular dystrophy patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **85**, 747–753 (2014).
239. Sardone, V. *et al.* A novel high-throughput immunofluorescence analysis method for quantifying dystrophin intensity in entire transverse sections of Duchenne muscular dystrophy muscle biopsy samples. *PLoS One* **13**, 1–21 (2018).
240. Torriano, S. *et al.* The effect of PTC124 on choroideremia fibroblasts and iPSC-derived RPE raises considerations for therapy. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).
241. Kayali, R. *et al.* Read-through compound 13 restores dystrophin expression and improves muscle function in the MDX mouse model for duchenne muscular

- dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 4007–4020 (2012).
242. Chilamakuri, C. S. R. *et al.* Performance comparison of four exome capture systems for deep sequencing. *BMC Genomics* **15**, (2014).
243. Wang, Q., Shashikant, C. S., Jensen, M., Altman, N. S. & Girirajan, S. Novel metrics to measure coverage in whole exome sequencing datasets reveal local and global non-uniformity. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
244. Trujillano, D. *et al.* A comprehensive global genotype–phenotype database for rare diseases. *Mol. Genet. Genomic Med.* **5**, 66–75 (2017).
245. Vasli, N. *et al.* Next generation sequencing for molecular diagnosis of neuromuscular diseases. *Acta Neuropathol.* **124**, 273–283 (2012).
246. Ankala, A.; Da Silva, C.; Gualandi, F.; Ferlini, A.; Bean, L.J.H; Collins, C.; Tanner, A.K.; Hegde, M. R. A comprehensive genomic approach for neuromuscular diseases gives a high diagnostic yield. *Ann. Neurol.* **77**, 206–214 (2015).
247. Tian, S., Yan, H., Kalmbach, M. & Slager, S. L. Impact of post-alignment processing in variant discovery from whole exome data. *BMC Bioinformatics* **17**, 1–13 (2016).
248. Kitamura, Y., Kondo, E., Urano, M., Aoki, R. & Saito, K. Target resequencing of neuromuscular disease-related genes using next-generation sequencing for patients with undiagnosed early-onset neuromuscular disorders. *J. Hum. Genet.* **61**, 931–942 (2016).
249. Hamilton, A. *et al.* Concordance between whole-exome sequencing and clinical Sanger sequencing: implications for patient care. *Mol. Genet. Genomic Med.* **4**, 504–512 (2016).
250. Beck, J. *et al.* Validation of next-generation sequencing technologies in genetic diagnosis of dementia. *Neurobiol. Aging* **35**, 261–265 (2014).
251. Yang, Y. *et al.* Clinical Whole-Exome Sequencing for the Diagnosis of Mendelian Disorders. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1502–1511 (2014).
252. Chae, J. H. *et al.* Utility of next generation sequencing in genetic diagnosis of early onset neuromuscular disorders. *J. Med. Genet.* **52**, 208–216 (2015).
253. Schulz, W. L., Tormey, C. A. & Torres, R. Computational Approach to Annotating Variants of Unknown Significance in Clinical Next Generation Sequencing. *Lab. Med.* **46**, 285–289 (2015).
254. Hunt, R. C., Simhadri, V. L., Iandoli, M., Sauna, Z. E. & Kimchi-Sarfaty, C. Exposing synonymous mutations. *Trends Genet.* **30**, 308–321 (2014).
255. Zhou, H. *et al.* Epigenetic Allele Silencing Unveils Recessive RYR1 Mutations in Core Myopathies. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 859–868 (2006).
256. Savarese, M. *et al.* Interpreting genetic variants in titin in patients with muscle disorders. *JAMA Neurol.* **75**, 557–565 (2018).
257. MacArthur, D.G.; Manolio, T.A.; Dimmock, D.P.; Rehm, H.L.; Shendure, J.; Abecasis, G.R.; Adams, D.R.; Altman, R.B.; Antonarakis, S.E.; Ashley, E.A.; Barrett, J.C.; Biesecker, L.G.; Conrad, D.F.; Cooper, G.M.; Cox, N.J.; Daly, M.J.; Gerstein, M.B.; Goldste, C. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* **508**, 469–476 (2014).
258. Hehir-Kwa, J. Y., Pfundt, R. & Veltman, J. A. Exome sequencing and whole genome sequencing for the detection of copy number variation. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **15**, 1023–1032 (2015).
259. Dunham, I. *et al.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57–74 (2012).

260. Donkervoort, S. *et al.* 'Double trouble': Diagnostic challenges in Duchenne muscular dystrophy in patients with an additional hereditary skeletal dysplasia. *Neuromuscul. Disord.* **23**, 955–961 (2013).
261. Scarlato, M. *et al.* A new double-trouble phenotype: fascioscapulohumeral muscular dystrophy ameliorates hereditary spastic paraparesis due to spastin mutation. *J. Neurol.* **262**, 476–478 (2014).
262. van Dijk, E.L.; Auger, H.; Jaszczyszyn, Y.; Thermes, C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* **30**, 418–426 (2014).

Annex de figures

Taula A: Relació entre els gens més diferencialment expressats i les vies enriquides

			Desenvolupament d'organismes multicel·lulars	Processos del desenvolupament	Processos del sistema immunitari	Desenvolupament d'òrgans	Fissió d'òrgànuls	Processos cel·lulars	Migració de leucòcits	Divisió cel·lular	Proliferació cel·lular	Homeòstasi iònica cel·lular	Mort	Diferenciació cel·lular	Resposta inflamatòria	Resposta a danys	Producció de citoquines
NM_015764	Greb1	gene regulated by estrogen in breast cancer protein															
NM_134072	Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14															
NM_175217	Mmd2	monocyte to macrophage differentiation-associated 2															
NM_013643	Ptpn5	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 5															
NM_008108	Gdf3	growth differentiation factor 3															
NM_033217	Ngfr	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)															
NM_178396	Car12	carbonic anhydrase 12															
NM_001033770	Gm904	predicted gene 904															
NM_011270	Rhd	Rh blood group, D antigen															
AK041110	Gm6416	predicted gene 6416															
NM_007429	Agtr2	angiotensin II receptor, type 2															
NM_138942	Dbh	dopamine beta hydroxylase															

* La taula segueix a la pàgina següent.

			Desenvolupament d'organismes multicel·lulars	Processos del desenvolupament	Processos del sistema immunitari	Desenvolupament d'òrgans	Fissió d'òrgànuls	Processos cel·lulars	Migració de leucòcits	Divisió cel·lular	Proliferació cel·lular	Homeòstasi iònica cel·lular	Mort	Diferenciació cel·lular	Resposta inflamatòria	Resposta a danys	Producció de citokines
NM_001252460	Cyfp2	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2															
NM_001032298	Bglap2	bone gamma-carboxyglutamate protein 2															
NM_001081147	Oxtr	oxytocin receptor															
NM_175448	Clvs2	clavesin 2															
NM_022025	Slc5a7	solute carrier family 5 (choline transporter), member 7															
NM_008829	Pgr	progesterone receptor															
NM_001008700	Il4ra	interleukin 4 receptor, alpha															
NM_001130419	Hpca	hippocalcin															
NM_008770	Cldn11	claudin 11															
NM_025290	Rsph1	radial spoke head 1 homolog (Chlamydomonas)															
NM_011061	Padi4	peptidyl arginine deiminase, type IV															
NM_011961	Plod2	procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2															

* La taula segueix a la pàgina següent.

			Desenvolupament d'organismes multicel·lulars	Processos del desenvolupament	Processos del sistema immunitari	Desenvolupament d'òrgans	Fissió d'òrgànuls	Processos cel·lulars	Migració de leucòcits	Divisió cel·lular	Proliferació cel·lular	Homeòstasi iònica cel·lular	Mort	Diferenciació cel·lular	Resposta inflamatòria	Resposta a danys	Producció de citoquines
NM_031368	Bglap-rs1	bone gamma-carboxyglutamate protein, related sequence 1															
XM_991187	Gm8700	predicted gene 8700															
NM_009892	Chi3l3	chitinase 3-like 3															
NM_008318	lbsp	integrin binding sialoprotein															
NM_023125	Kng1	kininogen 1															
NM_001005232	Dbx1	developing brain homeobox 1															
NM_175506	Adamts19	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 19															
NM_010052	Dlk1	delta-like 1 homolog (Drosophila)															
NM_010678	Aff3	AF4/FMR2 family, member 3															
NM_001113204	Ncam1	neural cell adhesion molecule 1															
NM_011837	Ly6h	lymphocyte antigen 6 complex, locus H															
NM_033616	Csprs	component of Sp100-rs															

* La taula segueix a la pàgina següent.

			Desenvolupament d'organismes multicel·lulars	Processos del desenvolupament	Processos del sistema immunitari	Desenvolupament d'òrgans	Fissió d'òrgànuls	Processos cel·lulars	Migració de leucòcits	Divisió cel·lular	Proliferació cel·lular	Homeòstasi iònica cel·lular	Mort	Diferenciació cel·lular	Resposta inflamatòria	Resposta a danys	Producció de citoquines
NM_134066	Akr1c18	aldo-keto reductase family 1, member C18															
NM_010640	Klk1b11	kallikrein 1-related peptidase b11															
NM_008161	Gpx3	glutathione peroxidase 3															
NM_173071	Bai2	brain-specific angiogenesis inhibitor 2															
AK134774	Spon1	spondin 1, (f-spondin) extracellular matrix protein															
NM_201375	Kng2	kininogen 2															
NM_007695	Chi3l1	chitinase 3-like 1															
NM_010078	Drp2	dystrophin related protein 2															
NM_023135	Sult1e1	sulfotransferase family 1E, member 1															
NM_009895	Cish	cytokine inducible SH2-containing protein															
NM_011134	Pon1	paraoxonase 1															
NM_145533	Smox	spermine oxidase															

* La taula segueix a la pàgina següent.

			Desenvolupament d'organismes multicel·lulars	Processos del desenvolupament	Processos del sistema immunitari	Desenvolupament d'òrgans	Fissió d'òrgànuls	Processos cel·lulars	Migració de leucòcits	Divisió cel·lular	Proliferació cel·lular	Homeòstasi iònica cel·lular	Mort	Diferenciació cel·lular	Resposta inflamatòria	Resposta a danys	Producció de citoquines
NM_001039677	Slc30a2	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 2															
XR_105325	Gm4665	predicted gene 4665															
NM_023755	Tfcp2l1	transcription factor CP2-like 1															
NM_007444	Amd2	S-adenosylmethionine decarboxylase 2															
NM_010650	Klra8	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 8															
NM_025734	Kcng4	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 4															
NM_026976	Faim3	Fas apoptotic inhibitory molecule 3															
NM_009022	Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2															
NM_025876	Cdk5rap1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1															
NM_053250	Crip3	cysteine-rich protein 3															
NM_010649	Klra4	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 4															
NM_010923	Nnat	neuronatin															

* La taula segueix a la pàgina següent.

			Desenvolupament d'organismes multicel·lulars	Processos del desenvolupament	Processos del sistema immunitari	Desenvolupament d'òrgans	Fissió d'òrgànuls	Processos cel·lulars	Migració de leucòcits	Divisió cel·lular	Proliferació cel·lular	Homeòstasi iònica cel·lular	Mort	Diferenciació cel·lular	Resposta inflamatòria	Resposta a danys	Producció de citoquines
NM_024470	Klra23	killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 23															
NM_001110323	Klra7	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 7															
NM_001122683	Bdh1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1															
NM_007817	Cyp2f2	cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2															
NM_138673	Stab2	stabilin 2															
NM_080639	Timp4	tissue inhibitor of metalloproteinase 4															
NM_053152	Klra22	killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 22															
NM_201531	Kcnf1	potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1															
NM_008339	Cd79b	CD79B antigen															
NM_026831	Mybphl	myosin binding protein H-like															
NM_028638	Gad1	glutamate decarboxylase-like 1															
NM_008072	Gabrd	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit delta															

* La taula segueix a la pàgina següent.

			Desenvolupament d'organismes multicel·lulars	Processos del desenvolupament	Processos del sistema immunitari	Desenvolupament d'òrgans	Fissió d'òrgànuls	Processos cel·lulars	Migració de leucòcits	Divisió cel·lular	Proliferació cel·lular	Homeòstasi iònica cel·lular	Mort	Diferenciació cel·lular	Resposta inflamatòria	Resposta a danys	Producció de citoquines
NM_016922	Gal3st1	galactose-3-O-sulfotransferase 1															
NM_021282	Cyp2e1	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1															
NM_008518	Ltb	lymphotoxin B															
NM_198632	Trim67	tripartite motif-containing 67															
NM_001243837	C7	complement component 7															
NM_013793	Klra15	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 15															
NM_008510	Xcl1	chemokine (C motif) ligand 1															
NM_173866	Gpt2	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2															
NM_001077353	Gsta3	glutathione S-transferase, alpha 3															
NM_007641	Ms4a1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1															
AK138801	Klrc1	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1															
AK032322	Atp2b3	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 3															

* La taula segueix a la pàgina següent.

			Desenvolupament d'organismes multicel·lulars	Processos del desenvolupament	Processos del sistema immunitari	Desenvolupament d'òrgans	Fissió d'òrgànuls	Processos cel·lulars	Migració de leucòcits	Divisió cel·lular	Proliferació cel·lular	Homeòstasi iònica cel·lular	Mort	Diferenciació cel·lular	Resposta inflamatòria	Resposta a danys	Producció de citoquines	
NM_007702	Cidea	cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A																
NM_144930	Ces1f	carboxylesterase 1F																
NM_019563	Cited4	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 4																
NM_008288	Hsd11b1	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1																
NM_016873	Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2																
NM_177789	Vsig4	V-set and immunoglobulin domain containing 4																
NM_027897	Rhpn2	rhopilin, Rho GTPase binding protein 2																
NM_021491	Smpd3	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral																
NM_001033340	Lrrc30	leucine rich repeat containing 30																
NM_008458	Serpina3c	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3C																
NM_183278	Fam25c	family with sequence similarity 25, member C																
NM_013599	Mmp9	matrix metallopeptidase 9																

* La taula segueix a la pàgina següent.

			Desenvolupament d'organismes multicel·lulars	Processos del desenvolupament	Processos del sistema immunitari	Desenvolupament d'òrgans	Fissió d'òrgànuls	Processos cel·lulars	Migració de leucòcits	Divisió cel·lular	Proliferació cel·lular	Homeòstasi iònica cel·lular	Mort	Diferenciació cel·lular	Resposta inflamatòria	Resposta a danys	Producció de citoquines
NM_008484	Lamb3	laminin, beta 3		■				■						■			
NM_153801	Tecrl	trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like															
NM_009114	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)			■			■	■								
NM_177639	Dlgap1	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1						■									

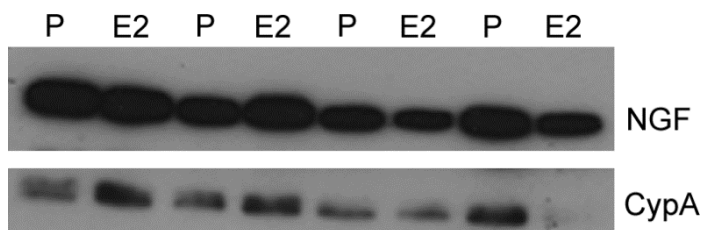


Figura A: Imatge del revelat del Western Blot per NGF i CypA.

Igual que en la quantificació de l'ARNm no s'observen diferències d'expressió entre els placebo i els tractats amb E2. Les quatre primeres mostres són d'animals que no van realitzar exercici i les altres quatre, que sí.

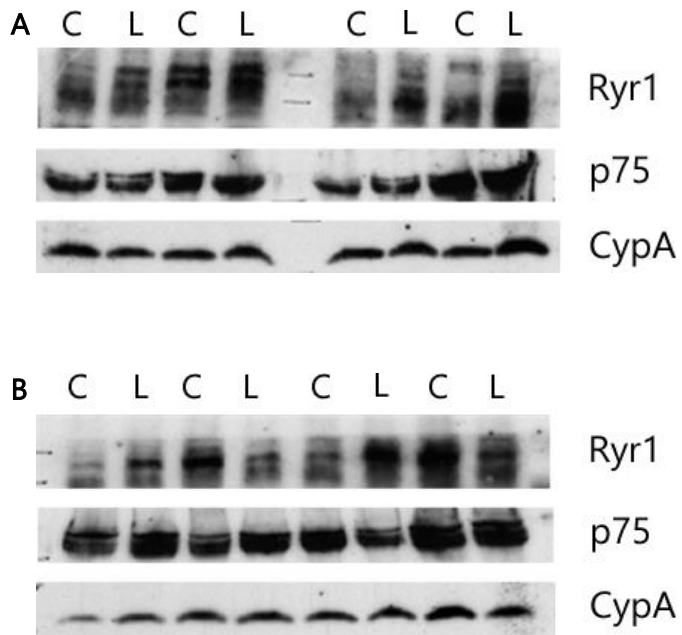


Figura B: Imatge del revelat del Western Blot per Ryr1 i p75^{NTR} i CypA.

(A) WB corresponent a mostres de quàdriceps del tractament amb LM11A-31 i els seus controls respectius. (B) El mateix que l'anterior però amb mostres de diafragma.

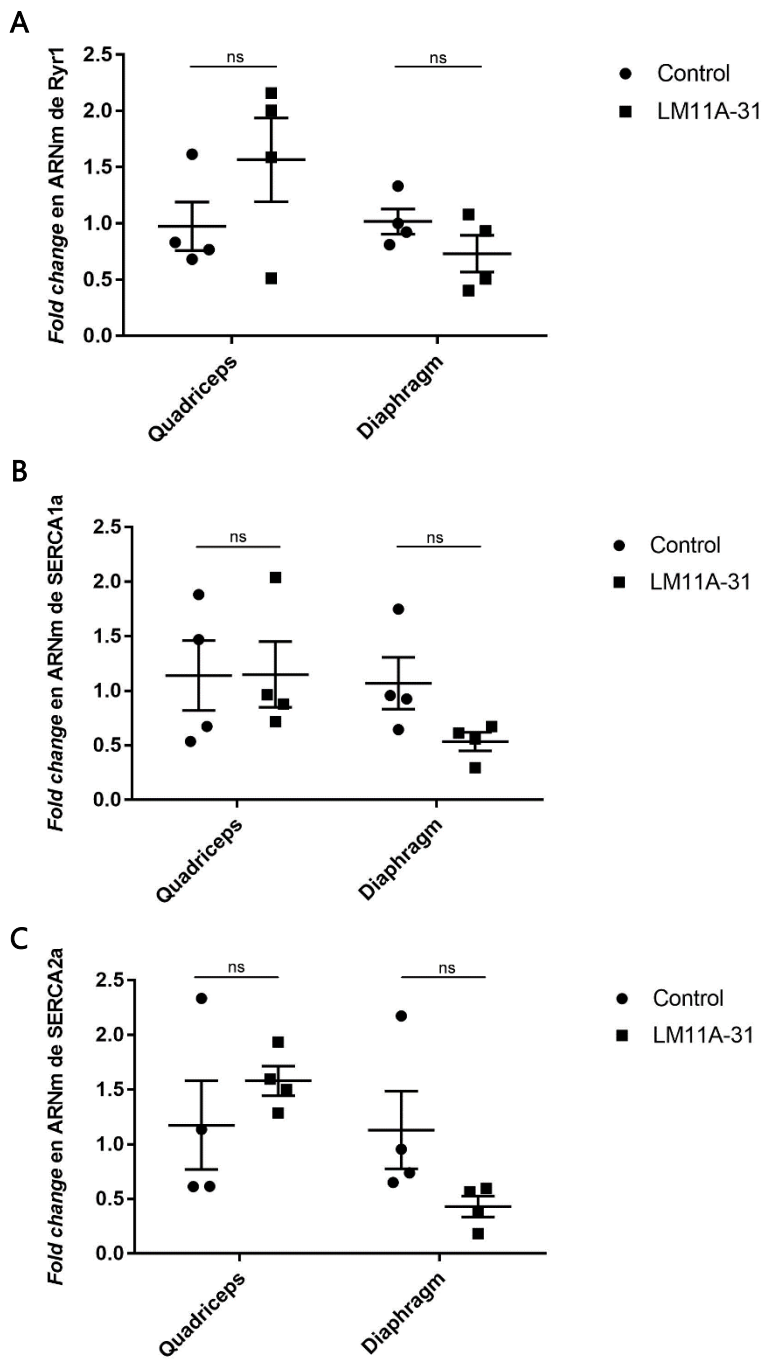


Figura C: Nivells d'expressió d'ARNm de Ryr1 (A), SERCA1a (B) i SERCA2a (C) en els animals tractats amb LM11A-31 i en el grup control.

Els valors de mitjana obtinguts per Ryr1 són de $0,97 \pm 0,21$ pels control i de $1,56 \pm 0,37$ pels LM11A-31, a quàdriceps; i de $1,01 \pm 0,11$ pels controls i de $0,73 \pm 0,16$ pels LM11A-31, a diafragma. Els valors de mitjana obtinguts per SERCA1a són de $1,14 \pm 0,32$ pels control i de $1,15 \pm 0,30$ pels LM11A-31, a quàdriceps; i de $1,07 \pm 0,24$ pels controls i de $0,53 \pm 0,08$ pels LM11A-31, a diafragma. I els valors de mitjana obtinguts per SERCA2a són de $1,18 \pm 0,40$ pels control i de $1,58 \pm 0,13$ pels LM11A-31, a quàdriceps; i de $1,13 \pm 0,35$ pels controls i de $0,43 \pm 0,095$ pels LM11A-31, a diafragma.

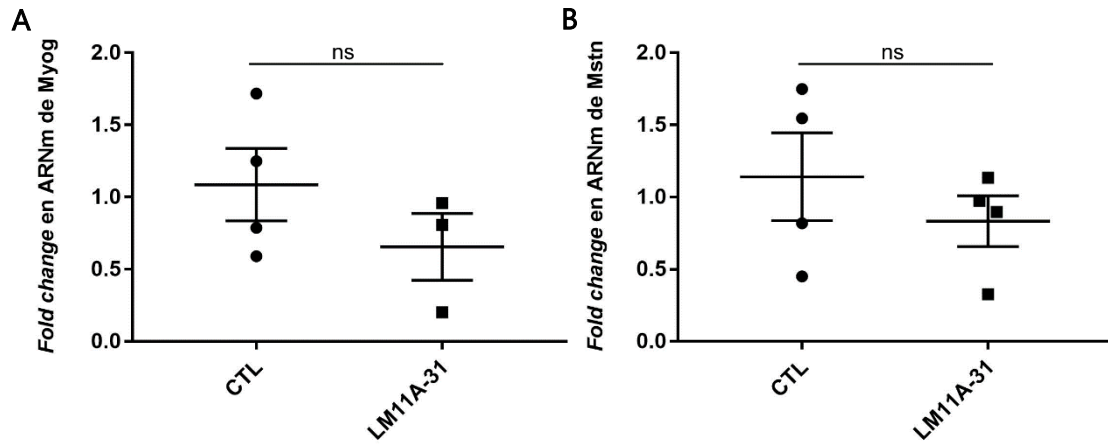


Figura D: Nivells d'expressió d'ARNm de Myog (A) i Mstn (B) en els animals tractats amb LM11A-31 i en el grup control.

Els valors de mitjana obtinguts per Myog són de $1,09 \pm 0,25$ pels control i de $0,66 \pm 0,23$ pels LM11A-31, a quàdriceps. Els valors de mitjana obtinguts per Mstn són de $1,14 \pm 0,30$ pels control i de $0,83 \pm 0,18$ pels LM11A-31, a quàdriceps.

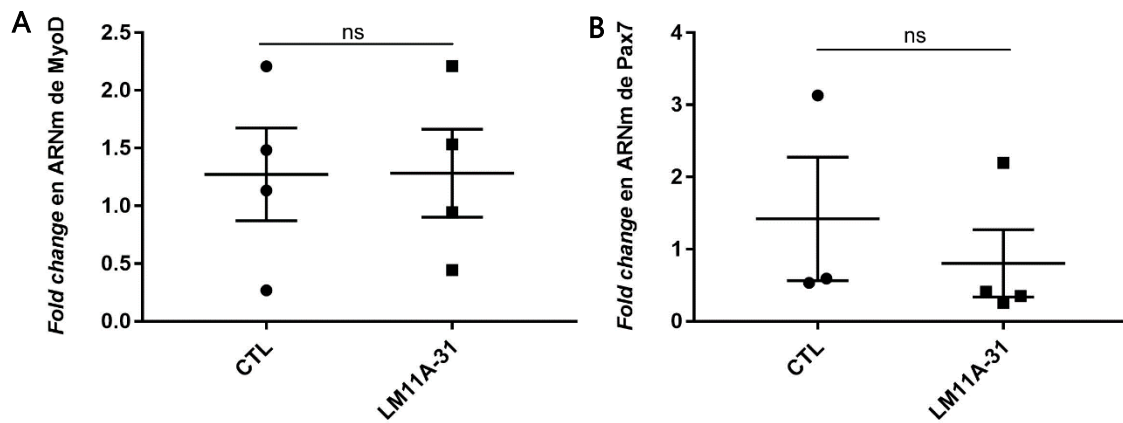


Figura E: Nivells d'expressió d'ARNm de MyoD (A) i Pax7 (B) en els animals tractats amb LM11A-31 i en el grup control.

Els valors de mitjana obtinguts per MyoD són de $1,27 \pm 0,40$ pels control i de $1,28 \pm 0,38$ pels LM11A-31, a quàdriceps. Els valors de mediana obtinguts per Pax7 són de $1,0595$ ($0,5365-3,133$) pels control i de $0,382$ ($0,282-1,752$) pels LM11A-31, a quàdriceps.

