






Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS
DE RESONANCIA MAGNÉTICA
MUSCULAR EN EL DIAGNÓSTICO
Y SEGUIMIENTO DE ENFERMEDADES
NEUROMUSCULARES**



Tesis presentada para optar al grado de Doctor

Doctoranda:

Alicia Alonso Jiménez

Director:

Dr. Jordi Díaz Manera

Tutora:

Dra. Isabel Illa Sendra



Universitat Autònoma
de Barcelona

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Programa de Doctorado en Medicina
Departamento de Medicina

BARCELONA, 2022

Hay pocas oportunidades en la vida en las que dispongamos de un folio en blanco para dar las gracias a todas aquellas personas con las que nos sentimos en deuda, a las que admiramos o agradecemos de un modo u otro el tiempo que nos han dedicado. Afortunadamente, la redacción de una tesis doctoral es una de esas oportunidades.

El camino que me ha traído hasta aquí ha sido largo: me ha llevado por distintas ciudades y países, he conocido a mucha gente excepcional y he tenido la oportunidad de aprender varios idiomas. A pesar del esfuerzo personal que le he dedicado a los obstáculos de dicho camino, tengo muy claro que recorrerlo no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas que, de forma más o menos casual, se han cruzado en mi vida. Con estas líneas pretendo darles las gracias a todos ellos, por haberme dedicado una parte de su tiempo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la doctora Illa que me concediera la oportunidad de formarme en la unidad de enfermedades neuromusculares del hospital de Sant Pau. Para mí ella ya era todo un referente en este campo, y tener la posibilidad de aprender de ella y su equipo ha sido todo un privilegio. En segundo lugar, gracias a Jordi, por haberme enseñado tanto, por la confianza depositada para la realización de estos proyectos y otros tantos y por haberme guiado en mis primeros pasos en el mundo de las enfermedades neuromusculares. Gracias por todas las horas que ha dedicado a explicarme conceptos, a revisar mis artículos, y por supuesto, a dirigir esta tesis. Gracias al resto de compañeros de Sant Pau: a Janina, por enseñarme a hacer EMG (una habilidad que me ha abierto muchas puertas), y por su ayuda con el catalán. A Luis, por su innegable pasión por la neuro-inmunología que todo lo impregna: es imposible no sentirse atraído por las inmunoglobulinas después de conocerle. Gracias también por toda esa ayuda brindada vía WhatsApp hasta el día de hoy. A Ricard: gracias por ser un ejemplo de la relación médico-paciente en casos tan difíciles como pacientes con ELA. A Elena, por su profesionalidad, su cercanía y su apoyo durante mis años en Sant Pau. Gracias también a los demás compañeros con quienes compartí las penurias típicas del becario: Jorge, Elba, Lorena y Rodrigo. Gracias a Sonia, por su ayuda con las bases de datos y, sobre todo, por las risas compartidas en los descansos. Gracias a Núria,

AGRADECIMIENTOS

por ser como es. Gracias a los compañeros del laboratorio: Eduard, Patricia, Xavi, Ana, Cinta, Noemí... por enseñarme que la medicina traslacional es la mejor manera de unir medicina e investigación, y especialmente gracias a Esther, por su excelente trabajo e inestimable colaboración para la realización de esta tesis. También quiero agradecer especialmente a Claudia su ayuda con la RM y todos esos ratos compartiendo anécdotas de perros y planes de futuro. Gracias a Aída, por ser tan cercana, por su ayuda con el análisis de RM y con el EMG y por haberme puesto en contacto con los compañeros del Clínic, abriéndome así las puertas a lo que fueron 8 meses inolvidables. Allí tuve la suerte de compartir tiempo y espacio con un equipo increíble, con quienes las horas de trabajo se hacían cortas, con quienes convierten una salita minúscula con microondas en el mejor restaurante del hospital, y la pizza “Cacho Pepe” en el mayor manjar del mundo. Gracias Judith, Josep, Jordi, Michela, Eva, David, Lili, Aurora, Lorena, Marc... os estoy infinitamente agradecida por todo lo que aprendí con vosotros: de medicina y de lo que no es medicina.

No me olvido de quienes me introdujeron a la Neurología durante mi residencia en Salamanca. Gracias a Jorge, por todas las horas en la planta fascinados con la semiología neurológica. Gracias a Yasmina, por ser inspiración para los residentes, por las facilidades que me brindó cuando las necesité, y por sus palabras de afecto y reconocimiento en mi último día de residencia. Gracias a Mónica, por crear un gran ambiente de trabajo con su sentido del humor. Gracias a Tomás, por enseñarme que la neurología va más allá del sistema nervioso central. Gracias a Antonio, por su sensatez y sus dichos populares. Gracias a Raquel, por darme la oportunidad de investigar durante mi formación. Y por supuesto, gracias a mis compañeros de residencia: Azu, Gus, Gum, Irene, Miriam, Javi, Mary, Luis... por los consejos 24h, por los cambios de guardia, por los desayunos y las quedadas fuera del hospital. Gracias a las enfermeras de la quinta derecha por su buen hacer, por compartir sus descansos en las guardias y por seguir disponibles para un café cuando vuelvo a Salamanca. Y gracias también a los amigos con quienes disfruté tantísimos momentos en esa maravillosa ciudad: Pablo, Tomás, Merce, Sussy, Peter...

Por supuesto, mi mayor agradecimiento es para quienes me han dedicado desinteresadamente la mitad de sus vidas: mi madre y mi padre. Ellos me han enseñado todo lo realmente importante de esta vida: desde hacer pis sin pañal hasta a tener pensamiento crítico. Me considero una persona increíblemente afortunada por haber crecido con ellos. A mi madre, sin duda, le hubiera encantado poder verme defender esta tesis. Aunque no se enterase de nada, me la imagino perfectamente en la silla del auditorio, rebosando orgullo. Porque ella siempre estuvo ahí cuando la necesité. En el salón de casa, en la estación de tren, en el aeropuerto o al otro lado del teléfono. Siempre tenía tiempo para mí. Además, no sé muy bien de dónde los sacaba, pero siempre tenía buenos consejos para cualquier situación, y si fallaban, tenía preparados los besos y abrazos más reconfortantes para los momentos difíciles. Ya le gustaría a Siri o Alexa tener la versatilidad, la capacidad y la velocidad de reacción para solucionar problemas que tenía mi madre. Siempre le agradeceré su apoyo, incluso con decisiones que significaban tenerme lejos de casa. También tengo mucho que agradecer a mi padre, que, aunque intentó inculcarme sus pasiones, como la música, y disuadirme de mi idea de estudiar medicina, no le salió bien. Resultó que tengo mejores manos para los pacientes que para el piano. Espero que me lo perdone... Los que le conocen saben que mi padre es un hombre de pocas palabras; él es más de demostrar las cosas con hechos, y lo cierto es que, si los kilómetros que ha recorrido en coche por mí los hubiera dedicado a viajar por placer, habría dado la vuelta al mundo tres veces. Gracias a mi hermano, por su humanidad, por su apoyo incondicional, y por su gran ayuda con mi última mudanza, ¡sola no habría podido sobrevivir al Ikea!. Gracias a mi abuela Kika, por haber sido mucho más que una abuela: una segunda madre. Y al resto de mi familia: muchísimas gracias también. Sabéis que os quiero muchísimo. Me habéis enseñado que, aunque en ocasiones parezca que estamos distanciados, en los momentos difíciles siempre estáis ahí, dispuestos a entregar todo el tiempo y el amor del mundo.

Me siento también muy agradecida de haber coincidido con unos compañeros de universidad fantásticos que siguen siendo amigos tantos años después. Gracias Marta A, por haber compartido tantos buenos momentos, por presentarme a tus amigas e invitarme a tus viajes. Gracias por tu empatía, y por tus apuntes, sin los cuales no sé si habría terminado

AGRADECIMIENTOS

la carrera... Gracias Marta G, por tu energía vital, tus risas, tus bailes con los que drenabas la energía de los demás... y ¡gracias por ser ese ejemplo a seguir como neuróloga! Gracias Laura, por tu comprensión infinita, por el esfuerzo que pones en mantener tus amistades, por los ratos de confidencias. Gracias Elena, por tu visión cosmopolita del mundo. Gracias Teresa, por demostrar que la medicina no es incompatible con otras pasiones. Gracias Miguel, por introducirme el couchsurfing y las relaciones internacionales.

Y no puedo olvidarme del colegio mayor, “el Johnny”, nido de mil anécdotas. Donde aprendí a servir el agua primero a los demás e hice amigos para toda la vida. Gracias Mari Ángeles, por seguir confiando en mí desde aquel primer café en la cafetería, y por enseñarme tantos sitios chulos en Barcelona. Gracias Vir y Pris, por ser compañeras en el camino de la ciencia, y gracias también a aquel héroe anónimo que nos invitó a cenar en el Minutejos. Gracias a Judith, por enseñarme a conocerme un poco mejor a mí misma, y a Luisa, por la segunda oportunidad.

Gracias a Fati, por abrirme las puertas del mundo con su curiosidad sin límites. Gracias a Julia, por los cientos de horas juntas desde que éramos niñas, y por sus aportaciones a la versión final de esta tesis. Gracias también a Aurora, Raquel y María, por los “consorcios de madres e hijas”. Gracias a Natalia y Alicia, por ser compañeras de aventuras durante tantos años ¡y por visitarme allá donde voy! Gracias a Irene, por una vida entera de risas y confidencias, y a su madre, Ana, por seguir ofreciéndome un hogar en la calle San Cosme.

Me gustaría también extender este agradecimiento a todos aquellos que han invertido parte de su tiempo en enseñar. Porque lo que aprendemos perdura con nosotros, porque unas horas de formación pueden sernos útiles por el resto de nuestra vida. Considero que los profesores forman una de las piezas más importantes de nuestra sociedad, a pesar de lo cual se encuentran frecuentemente infravalorados. Por ello, gracias a mis profesores del colegio, del instituto y de la facultad, a mis profesores de idiomas y de deportes, a mi instructor de las clases de conducir y a todas las personas que han dedicado tiempo a enseñar. Y si la enseñanza y el conocimiento son importantes, hacerlos accesibles es

primordial. Por ello me uno a los numerosos doctorandos que añaden Sci-Hub a sus agradecimientos, porque esta plataforma ha permitido hacer accesible el conocimiento a la comunidad científica. A mi, personalmente, me ha hecho mejor médica; me ha permitido mejorar mi toma de decisiones, y con ello, la atención a mis pacientes. Me gustaría también mencionar otras dos plataformas detrás de las cuales hay muchos profesionales dedicando tiempo a ofrecer la mejor y más actualizada información para que el resto de médicos del mundo podamos ponerla al servicio de nuestros pacientes: “UpToDate” y “Neuromuscular”, de la universidad Washington, in St. Louis. Creo que no hay médico que no conozca la primera, y no hay “neuromusculólogo” que no conozca la segunda.

Gracias a Sergio, por el excelente trabajo de maquetación de esta tesis, y a Beatriz Marcos, por el espectacular diseño de la portada.

Gracias a los pacientes, por su confianza y por ser fuente de inspiración para seguir estudiando y aprendiendo cada día. Especialmente gracias a todos los que colaboraron en los estudios recopilados en esta tesis.

I would also like to thank my colleagues and friends from Antwerp, the place where I have lived since June 2019. First of all, thanks to Patrick and Jonathan for hiring me, even though I did not speak one word of Dutch. Thank you for providing time enough to learn the language. Particular thanks to Jonathan, for being such a good workmate, and for your patience and trust. Thanks to the rest of the NMRC team: Iris, Elke and Reinhilde: I seriously don't know what I would do without your help! Peter: sitting at the desk next to you is the best way to “casually” learn new things every day. Willem: thanks for joining the team! What an upgrade! Rudy: thanks for your endless enthusiasm in neurology. I'll always remember when you said: “Now that I start being good at something, I have to retire!”.

Thanks to the rest of my colleagues from the neurology department of the University Hospital of Antwerp. It is because of your understanding and your predisposition to help that I have

AGRADECIMIENTOS

had such a good experience in this new country. Special thanks to: Jonathan (*de kleine*) for teaching me some of my very useful first words in Dutch (*wil je een koffietje?*) and for his company throughout my first months at the hospital; to Femke, for being my first *nederlands-talige vriendin*, and to Ana, for providing that necessary break from Dutch when my brain was about to explode.

Thanks as well to my friends from Antwerp. I consider myself very lucky for having met you before COVID-19 changed our lives. The pandemic would have been much worse without our online kahoot quizzes, your casual visits to drop chocolate or an easter egg at our door, our literary *wandelingen*, coffees to go and padel games.

Last but not least, I would like to thank my life partner, John Wilkos. Thanks for teaching me that understanding goes beyond languages. Thanks for your endless support, for your kind words whenever I need them, for predicting my bad days and smoothing them over... Thanks for valuing my work and for agreeing to follow me around the world across 3 different countries, even though it meant new challenges for you too. I'm so lucky I got to live this last 11 years with you. I love you.

- #** **10MWT:** Run/Walk 10 Meters Test / Test de Marcha Rápida de 10 Metros
6MWT: 6-Minute Walk Test / Test de la Marcha de los 6 Minutos
- A** **AAV:** Adeno-Associated Virus / Virus Adenoasociado
ALT: Alanina Aminotransferasa
AST: Aspartato Aminotransferasa
- B** **BMD:** Becker Muscular Dystrophy / Distrofia Muscular de Becker
- C** **CK:** Creatinina Kinasa
CRIM: Cross-Reactive Immunological Material
CTGF: Connective Tissue Growth Factor / Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo
- D** **DMD:** Duchenne Muscular Dystrophy / Distrofia Muscular de Duchenne
DNA: Deoxyribonucleid acid / Ácido desoxirribonucleico
DOF/OPMD: Distrofia Oculofaríngea
DYSF: Dysferlinopathy / Disferlinopatía
- E** **EMA:** European Medicines Agency / Agencia Europea de Medicamentos
EMG: Electromiografía
ERT: Enzyme Replacement Therapy / Terapia de Reemplazo Enzimático
- F** **FDA:** US Food and Drug Administration / Administración de Alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
FEV1: Forced Expiratory Volume in 1 Second / Volumen Espiratorio Forzado en 1 Segundo
FF: Fat Fraction / Fracción de Grasa
FLAIR: Fluid Attenuated Inversion Recovery
FSH: Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy / Distrofia Facioescapulohumeral
FVC: Forced Vital Capacity / Capacidad Vital Forzada
- I**
- L**
- M** **IL:** Interleukin / Interleucina
LGMD: Limb-Girdle Muscular Dystrophy / Distrofia Muscular de Cinturas
MFM: Motor Function Measurement Scale / Escala de Medición de la Función Motora
MRC: Medical Research Council Muscle Scale
- N**
- P** **NSAA:** North Star Ambulatory Assessment
PABPN1: Polyadenylate-Binding Protein Nuclear 1
PAS: Periodic Acid Schiff / Ácido Peryódico de Schiff
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor / Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PEG: Percutaneous Endoscopic Gastrostomy / Sonda de Alimentación Percutánea
PET: Positron Emission Tomography / Tomografía por emisión de positrones
PUL: Performance of the Upper Limb Test

R

rhGAA: Recombinant Human Acid α -Glucosidase / α -Glucosilasa Recombinante Humana

RM: Resonancia Magnética

RNA: Ribonucleic Acid / Ácido Ribonucleico

RNAm: RNA Mensajero

ROIs: Regions Of Interest / Regiones de Interés

**S
T**

STIR: Short Time Inversion Recovery

TC: Tomografía Computarizada

Tdo4: Time to Descend 4 Stairs test

TE: Tiempo de Eco

TGF- β 1: Transforming Growth Factor β 1 / Factor de Crecimiento Transformante β 1

TR: Tiempo de Repetición

TRF: Time to Rise from the Floor Test

Tup4: Time to Climb 4 Stairs Test

RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. MIOPATÍAS HEREDITARIAS	19
1.1.1. Tipos de miopatías hereditarias	20
1.1.1.1. Distrofias musculares	20
1.1.1.2. Miopatías metabólicas	22
1.1.1.3. Miopatías congénitas	22
1.1.1.4. Canalopatías del músculo esquelético	23
1.1.2. Diagnóstico de las miopatías hereditarias	23
1.1.2.1. Analítica	23
1.1.2.2. Electromiografía	24
1.1.2.3. Técnicas de Imagen	24
1.1.2.4. Biopsia Muscular	24
1.1.2.5. Estudio Genético	25
1.1.2.6. Consecuencias del diagnóstico	25
1.2. TÉCNICAS DE IMAGEN EN EL SEGUIMIENTO DE LAS MIOPATÍAS HEREDITARIAS	26
1.2.1. Resonancia magnética	26
1.2.1.1. Bases físicas	27
1.2.1.1.1. <i>Concepto de espín nuclear</i>	27
1.2.1.1.2. <i>Excitación y relajación nuclear</i>	31
1.2.1.1.3. <i>Potenciación en T1 y T2</i>	33
1.2.1.3. Técnicas convencionales	35
1.2.1.3.1. <i>Secuencia espín-eco</i>	36
1.2.1.3.2. <i>Secuencia de inversión-recuperación o inversion recovery (STIR, FLAIR)</i>	36
1.2.1.3.3. <i>Secuencia de eco por gradiente</i>	37
1.2.1.4. Técnicas avanzadas	38
1.2.1.4.1. <i>Dixon</i>	38
1.2.1.4.2. <i>Espectroscopia</i>	39
1.2.1.4.3. <i>Difusión</i>	39
1.2.1.4.4. <i>Perfusión</i>	40
1.2.1.5. Aplicación al estudio de miopatías hereditarias	40
1.2.2. Otras técnicas	44
1.2.2.1. Ecografía	44
1.2.2.2. Tomografía Computarizada	45
1.3. DISTROFINOPATÍAS: ENFERMEDADES DE DUCHENNE Y BECKER	46
1.3.1. Distrofia muscular de Duchenne	47
1.3.1.1. Tratamiento de la DMD	47
1.3.1.1.1. <i>Glucocorticoides</i>	48
1.3.1.1.2. <i>Otras terapias</i>	48
1.3.1.1.2.1. <i>Terapias dirigidas a aumentar la expresión de distrofina</i>	49
1.3.1.1.2.1.1. <i>Oligonucleótidos antisentido</i>	49
1.3.1.1.2.1.2. <i>Terapia génica</i>	50
1.3.1.1.2.2. <i>Terapias dirigidas a la supresión del proceso fibrótico</i>	50
1.3.2. Distrofia muscular de Becker (BMD)	50
1.3.3. Mujeres portadoras	51
1.3.4. Evaluación de la progresión de la enfermedad	52
1.3.5. Técnicas de RM aplicadas a las distrofinopatías	53
1.4. DISTROFIA OCULOFARÍNGEA	56
1.4.1. Tratamiento	60
1.4.2. Técnicas de RM en la DOF	61

1.5. ENFERMEDAD DE POMPE	62
1.5.1. Enfermedad de Pompe infantil precoz	64
1.5.2. Enfermedad de Pompe juvenil	64
1.5.3. Enfermedad de Pompe del adulto o de inicio tardío	64
1.5.4. Tratamiento en la enfermedad de Pompe	65
1.5.5. Técnicas de RM en la enfermedad de Pompe del adulto	66
2. HIPÓTESIS	71
3. OBJETIVOS	75
4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES	79
4.1. ARTÍCULO 1:	81
4.1.1. Publicación original	82
4.2. ARTÍCULO 2:	93
4.2.1. Publicación original	94
4.3. ARTÍCULO 3:	105
4.3.1. Publicación original	106
5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS	115
6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN	125
7. CONCLUSIONES	131
8. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	135
9. BIBLIOGRAFÍA	139
10. ANEXOS	155
10.1. ANEXO 1	157

RESUMEN

La resonancia magnética (RM) se ha establecido como una herramienta útil en el estudio de las enfermedades neuromusculares. Dentro de ellas, las miopatías hereditarias forman un grupo heterogéneo que tienen en común el origen genético.

En esta tesis exploramos la utilidad de la RM en un grupo de miopatías hereditarias (distrofia oculofaríngea [DOF], disferlinopatía [DYSF], distrofia facioescapulohumeral [FSH] y distrofias musculares de Duchenne [DMD] y Becker [BMD]), y planteamos cuestiones técnicas sobre el análisis de las imágenes Dixon utilizando como ejemplo la enfermedad de Pompe.

Para el estudio en DOF colectamos datos clínicos y RM musculares de 168 pacientes. Encontramos un patrón común de afectación con infiltración precoz de la lengua, el *adductor magnus* y el *soleus*, y demostramos también correlación clínico-radiológica.

Para evaluar la utilidad de las técnicas Dixon estudiamos pacientes con FSH, DYSF, DMD y BMD, encontrando correlación entre las pruebas físicas y la infiltración grasa. Además, exploramos la utilidad de factores de crecimiento implicados en el proceso de fibrosis muscular como posibles biomarcadores. Hallamos que el factor de crecimiento dependiente de las plaquetas-AA (PDGF-AA) correlaciona con las pruebas físicas en las distrofinopatías y con la RM en BMD.

En el tercer estudio comparamos 3 estrategias de análisis de las imágenes Dixon en 34 pacientes con enfermedad de Pompe, con el objetivo de establecer cual de las 3 es más eficiente. Las tres estrategias correlacionaron con las pruebas físicas, pero el incremento de infiltración al año de seguimiento no mostró diferencias entre los tres métodos, lo que indica que una estrategia de análisis global puede ser más eficiente para estudios de seguimiento.

En conclusión, la RM muscular es útil para el diagnóstico de la DOF y para el seguimiento de las distrofias musculares aquí descritas. El análisis de las imágenes Dixon puede en ocasiones realizarse de forma global ahorrando así tiempo.

ABSTRACT

Magnetic resonance imaging (MRI) has been established recently as a useful tool for the study of patients with neuromuscular disorders. Among these diseases, hereditary myopathies form a heterogeneous group which are genetic in nature.

In the present thesis we explore the usefulness of MRI in a group of hereditary myopathies (Oculopharyngeal muscular dystrophy [OPMD], dysferlinopathy [Dysf], facioscapulohumeral dystrophy [FSH], Duchenne muscular dystrophy [DMD] and Becker muscular dystrophy [BMD]), and question technical issues in the analysis of Dixon images using Pompe disease as an example.

In our first study we collected clinical and MRI data of 168 patients with OPMD. We found a common pattern of fat replacement with characteristic early involvement of the tongue, *adductor magnus*, and *soleus*. We also showed clinical-radiological correlation.

To explore the utility of the Dixon technique to quantify fat infiltration, we studied patients with FSH, Dysf, DMD, and BMD. We found correlations between the physical tests and fat replacement. Furthermore, we investigated the usefulness of growth factors implicated in muscle fibrosis as possible biomarkers. Platelet-derived growth factor AA (PDGF-AA) correlated with physical tests and with MRI in BMD.

In our third study we compared three strategies of analysis of Dixon images in 34 patients with Pompe disease with the goal of finding the most efficient one. We found that the three strategies correlated with physical tests. However, the fat replacement increment after one year of follow-up did not show differences among the three methods, which suggests that a global strategy of analysis could be more efficient for follow-up studies.

In conclusion, muscle MRI is useful for the diagnosis of OPMD and the follow-up of the muscle dystrophy that we describe here. Regarding the analysis of Dixon images, a global approach can in some situations be adequate as well as time-saving.

1

INTRODUCCIÓN



1.1. MIOPATÍAS HEREDITARIAS

El término “miopatía” proviene del griego ‘my(o)’ -(músculo) y ‘pátheia’ -(enfermedad) ¹ y engloba un amplio y heterogéneo grupo de enfermedades que se caracterizan por afectación específica (aunque no tiene por qué ser exclusiva) del tejido muscular esquelético y/o cardíaco.

En una primera aproximación a la clasificación, las miopatías suelen dividirse en hereditarias y adquiridas. En esta tesis nos centraremos en el primer grupo, por ser el grupo objetivo de los estudios que hemos llevado a cabo.

Las miopatías hereditarias son causadas mayoritariamente por mutaciones en genes que afectan a la línea germinal y son, por tanto, transmisibles a la descendencia. Un pequeño grupo son debidas a mutaciones en el DNA mitocondrial. Tanto el patrón de herencia como la penetrancia varía de unas entidades a otras. Suelen clasificarse atendiendo a criterios anatomopatológicos y clínicos, aunque los vertiginosos avances que el campo de la genética está atravesando en las últimas décadas, complican dicha clasificación, ya que mutaciones en un mismo gen pueden dar lugar a distintos fenotipos y, a su vez, un mismo fenotipo de enfermedad puede originarse por mutaciones en genes diferentes ²⁻⁴.

A pesar de que el fenotipo puede ser similar en distintas enfermedades, es importante conocer y diferenciar el mecanismo fisiopatológico subyacente que en última instancia produce la degeneración muscular, ya que tiene implicaciones de cara al seguimiento y tratamiento, así como para el desarrollo de nuevas terapias.

El diagnóstico y seguimiento de las miopatías hereditarias es complejo. A continuación, se exponen de forma general los diversos tipos y las herramientas diagnósticas, para posteriormente introducirnos en las cuatro enfermedades objeto de esta tesis: las distrofias musculares de Duchenne (DMD) y Becker (BMD), la distrofia oculofaríngea (DOF) y la enfermedad de Pompe.

1.1.1. Tipos de miopatías hereditarias

1.1.1.1. Distrofias musculares

Las distrofias musculares se caracterizan por una lenta y gradual degeneración del tejido muscular que conlleva el desarrollo de debilidad progresiva. La gravedad puede ser muy variable en función del tipo de distrofia y de la edad de presentación, que puede ser desde el nacimiento hasta la edad adulta tardía. La musculatura respiratoria y cardíaca también pueden afectarse en ciertas distrofias, lo que tiene una gran influencia sobre el pronóstico vital. Otros órganos, como el cerebro o la piel también pueden verse afectados en algunos casos⁵⁻⁷.

Las distrofias musculares pueden clasificarse clínicamente en distrofias de cinturas (en las que se afecta predominantemente la musculatura proximal) y miopatías distales (en las que predomina la afectación distal). Desde un punto de vista genético, pueden clasificarse, en función del patrón de herencia en autosómicas dominantes, recesivas, ligadas al cromosoma X o esporádicas. Algunas distrofias musculares tienen rasgos clínicos muy característicos por lo que tradicionalmente se han considerado entidades propias. Es el caso de la distrofia de Steinert, caracterizada por la presencia de miotonía, o la distrofia muscular de Emery-Dreifuss, que cursa con contracturas articulares prominentes en la musculatura axial, en codos y tendones de Aquiles. Las miopatías producidas por mutaciones en el DNA mitocondrial suelen considerarse un grupo a parte (miopatías mitocondriales).

Desde el punto de vista histológico, las distrofias musculares se caracterizan por la presencia de degeneración y regeneración de fibras musculares, aumento del número de núcleos centrales, incremento en la variabilidad del tamaño de las fibras y aumento de tejido conectivo y grasa⁸.

A pesar de características histológicas similares, el mecanismo fisiopatológico que conduce a la degeneración muscular varía entre las diferentes distrofias. El origen es un defecto genético que conduce a la producción deficitaria o anómala de una proteína de la fibra

muscular, lo que conlleva una disfunción de la fibra. Se han descrito defectos en el sarcolema, en la matriz extracelular, en el citoesqueleto, en el aparato de Golgi, en la membrana nuclear, en el sistema contráctil, el citoplasma y la unión neuromuscular, así como en las proteínas involucradas en el proceso de glicosilación de otras proteínas (**Figura 1.1**)

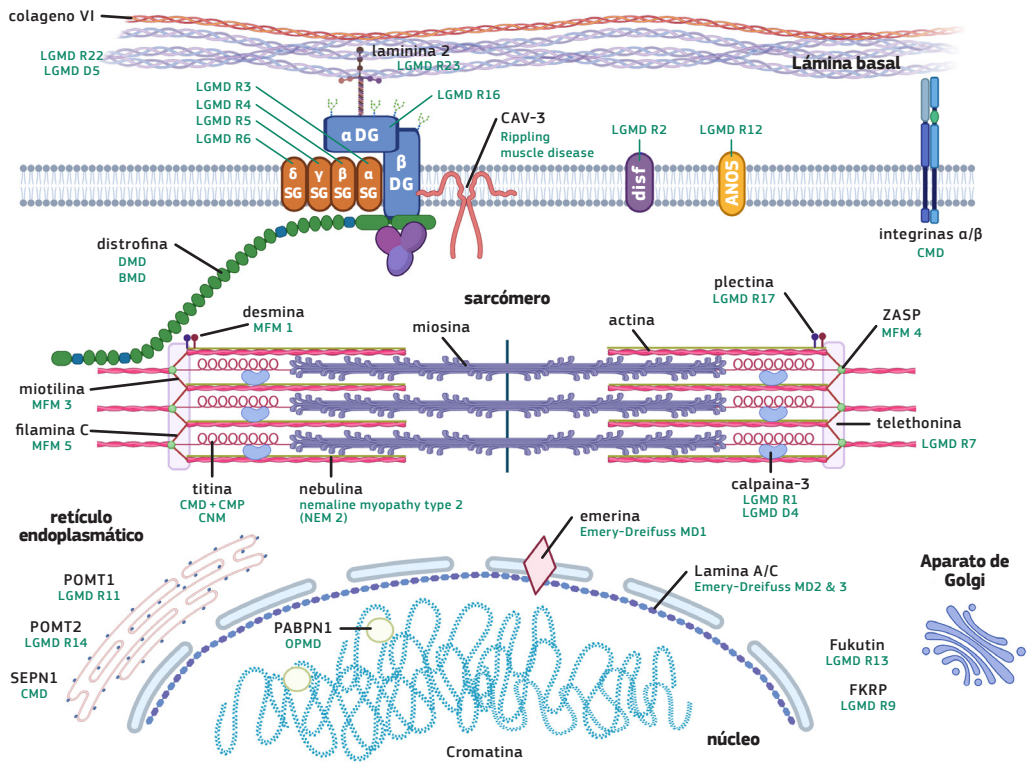


Figura 1. 1: Representación esquemática de los componentes de la fibra muscular y las miopatías resultantes de la mutación en cada uno de los genes.

LGMD: limb-girdle muscular dystrophy. **DG:** Destroglicano. **SG:** Sarcoglicano. **CAV-3:** Caveolina 3.

Disf: Disferlina. **ANOS:** Anoctamina 5. **DMD:** Distrofia Muscular de Duchenne. **BMD:** Distrofia muscular de Becker. **CMD:** Congenital Muscular Dystrophy. **MFM:** Miofibrillar myopathy.

CNM: Centronuclear myopathy. **CMP:** Cardiomyopathy. **OPMD:** Oculopharyngeal Muscular Dystrophy (distrofia oculofaríngea). **ZASP:** Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein.

FKRP: Fukutin-related protein. *Imagen creada con BioRender*

En los últimos 30 años se han descrito gran cantidad de genes implicados en las distrofias musculares, y la lista no para de crecer a medida que el conocimiento sobre genética se expande y los costes de los estudios genéticos se reducen⁹.

1.1.1.2. Miopatías metabólicas

Las miopatías metabólicas son enfermedades musculares hereditarias en las que el defecto genético afecta a la síntesis de enzimas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos o de los lípidos, lo que conduce a un desequilibrio entre demanda y oferta energética. Pueden desarrollarse tanto en la infancia como en la edad adulta, y clínicamente comparten dos modos de presentación: **1-** episodios recurrentes de intolerancia al ejercicio en los que el paciente sufre calambres, contracturas y dolor muscular, que pueden incluso llevar a la ruptura de fibras musculares (rabdomiólisis) con su excreción en orina (mioglobiuria); **2-** desarrollo progresivo de debilidad y atrofia muscular.

Las miopatías metabólicas que afectan al metabolismo de los carbohidratos son las denominadas glucogenosis. Se han descrito aproximadamente 15 tipos en función de la enzima deficitaria, siendo las más frecuentes la glucogenosis tipo V o enfermedad de McArdle y la glucogenosis tipo II o enfermedad de Pompe, la cual se discutirá en profundidad en el apartado 5 de esta introducción.

Por otro lado, las miopatías lipídicas son aquellas producidas como consecuencia del mal funcionamiento de enzimas involucradas en el metabolismo de las grasas. Estas enfermedades son más frecuentes en la infancia, suelen ser multisistémicas y desde un punto de vista anatomopatológico, se caracterizan por la presencia de gotas lipídicas en las fibras musculares, visibles con tinciones específicas (como el *red oil* o el *sudan black*) o microscopía electrónica¹⁰.

1.1.1.3. Miopatías congénitas

Bajo el término “miopatías congénitas” se incluyen un grupo de miopatías genéticamente determinadas que se inician en el nacimiento o en los primeros meses de vida. Tienen características clínicas comunes, como la debilidad de la musculatura facial, posible afectación de pares craneales, paladar ojival y la debilidad muscular de predominio proximal, y hallazgos característicos en la biopsia muscular, como la presencia de cores (miopatía con cores centrales o miopatía con minicores), bastones o inclusiones de nemalina (miopatía

nemalínica) o núcleos centrales (miopatía centronuclear). El diagnóstico genético de las miopatías congénitas también es complejo, existiendo, por un lado, diferentes genes que producen el mismo fenotipo y hallazgos anatomopatológicos comunes, y por otro lado, con un mismo gen dando origen a fenotipos y cambios histológicos diferentes ¹¹.

1.1.1.4. Canalopatías del músculo esquelético

Las canalopatías se producen como consecuencia de la disfunción de canales iónicos de la membrana plasmática de la fibra muscular. Estos canales cumplen una función crucial para la estabilidad de la excitabilidad del sarcolema, por lo que su disfunción se manifiesta como debilidad (incapacidad para producir contracción muscular) o como miotonía (incapacidad para relajar el músculo) ¹².

1.1.2. Diagnóstico de las miopatías hereditarias

La complejidad clínica y fisiopatológica y lo intrincado del diagnóstico genético, implican un diagnóstico diferencial amplio y una aproximación diagnóstica compleja. El primer paso es establecer una sospecha en base a la forma de presentación, las características clínicas y el patrón de herencia. Aunque esta tesis se centra en las miopatías hereditarias, en la práctica clínica habitual debemos considerar también las miopatías adquiridas o trastornos neurógenos. Por tanto, una correcta anamnesis y exploración física son por tanto fundamentales para orientar el diagnóstico. Disponemos de distintas pruebas complementarias para ayudarnos en este proceso.

1.1.2.1. Analítica

La analítica sanguínea puede servirnos para confirmar el daño muscular, así como para descartar causas adquiridas de miopatía (como las miopatías inflamatorias o tóxicas).

Uno de los parámetros más utilizados en el diagnóstico de miopatías es la determinación de los niveles de **creatina kinasa (CK)** en suero. Se trata de una enzima contenida en las fibras musculares y que se libera en los casos de daño muscular. La elevación de sus niveles en

1 INTRODUCCIÓN

sangre apoya el diagnóstico de miopatía, pero hay que tener en cuenta que es inespecífica y debe ser interpretada dentro del contexto clínico. Otras enzimas que se pueden elevar de forma inespecífica son la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT).

Algunos déficits enzimáticos pueden detectarse en sangre u orina. Es el caso del déficit de ***α-glucosidasa ácida***, cuya actividad puede medirse en los linfocitos de sangre periférica, como comentaremos más adelante.

1.1.2.2. Electromiografía

La electromiografía (EMG) es útil para localizar topográficamente el origen de la debilidad. Permite identificar lesiones de origen en el nervio periférico, en la raíz espinal, en la neurona motora, en la unión neuromuscular o en el músculo. Aun así, es importante destacar que una EMG normal no descarta una enfermedad muscular, ya que, si no se examinan músculos específicamente afectados, el estudio puede no mostrar alteraciones.

1.1.2.3. Técnicas de Imagen

Las técnicas de imagen aplicadas al diagnóstico de miopatías son muy prometedoras y se discutirán en profundidad más adelante (apartado 2 de esta introducción).

1.1.2.4. Biopsia Muscular

El estudio microscópico del tejido muscular es de gran utilidad. Es importante seleccionar adecuadamente el músculo a biopsiar para obtener mayor rentabilidad diagnóstica. Las técnicas de imagen son útiles para este propósito. Mediante tinciones histológicas e histoquímicas pueden identificarse características de las enfermedades musculares en general, así como particularidades de las distintas entidades.

Disponer de tejido muscular es, además, útil para realizar estudios inmunohistoquímicos mediante inmunoblot, lo que permite estudiar la ausencia o reducción de proteínas específicas.

Así mismo, en el tejido muscular puede ser ocasionalmente útil como fuente de DNA (por ejemplo, en casos de mosaicismo somático) o para la realización del test de contractura muscular *in vitro* que se utiliza para el diagnóstico de la hipertermia maligna.

1.1.2.5. Estudio Genético

El diagnóstico genético es la prueba definitiva de confirmación de la enfermedad, pero es fundamental que los resultados se interpreten adecuadamente por especialistas con experiencia, para evitar diagnósticos erróneos. El primer gen que se consiguió secuenciar en 1987 fue el gen *DMD*¹³, cuya mutación es responsable de la DMD y la BMD. Desde entonces se han descrito cientos de genes relacionados con enfermedades neuromusculares, los cuáles pueden consultarse online^{3,4}.

El diagnóstico genético ha cambiado radicalmente en los últimos años. Inicialmente se realizaba secuenciación de los genes de interés mediante técnicas de Sanger, lo que era costoso y lento. Actualmente se han popularizado las técnicas de secuenciación masiva en forma de paneles de genes, exoma o genomas que permiten analizar cientos de genes o incluso todo el genoma de forma concomitante. Estas técnicas permiten llegar al diagnóstico de los pacientes de forma más rápida y además han permitido expandir el número de genes asociados a enfermedades neuromusculares.

1.1.2.6. Consecuencias del diagnóstico

Establecer el diagnóstico correcto es de gran importancia por diversos motivos. En primer lugar, el mero hecho de conocer el diagnóstico reduce la ansiedad de los pacientes, muchos de los cuales llevan años conviviendo con la incertidumbre. En segundo lugar, permite ofrecer el tratamiento más adecuado. En el caso de algunas enfermedades, como la enfermedad de Pompe o algunas miopatías lipídicas, existen tratamientos específicos que retrasan la evolución de la enfermedad. En otras, como la miastenia congénita o las miopatías miotónicas, se pueden aplicar tratamientos sintomáticos que mejoran la calidad de vida. Otras enfermedades no disponen de un tratamiento capaz de cambiar la historia natural, pero conocer

el diagnóstico permite establecer expectativas claras con el paciente sobre la evolución de su patología. Además, conocer el diagnóstico nos permite anticiparnos a las posibles complicaciones que puedan surgir. Esto es de gran importancia en aquellas miopatías que asocian trastornos de la conducción cardiaca o miocardiopatías, ya que nos permitirá implantar marcapasos o desfibriladores en aquellos pacientes de riesgo. Conocer la historia natural de la enfermedad también nos permitirá aconsejar al paciente sobre beneficios o inconvenientes de posibles intervenciones quirúrgicas o de otra índole. Por último, el diagnóstico de certeza nos permitirá ofrecer consejo genético. Podremos identificar a otros miembros de la familia con la misma enfermedad o con riesgo de desarrollarla, y podremos ofrecer alternativas para evitar la transmisión a la descendencia.

1.2. TÉCNICAS DE IMAGEN EN EL SEGUIMIENTO DE LAS MIOPATÍAS HEREDITARIAS

Las técnicas de imagen permiten una aproximación al estudio de los tejidos del organismo de una forma no invasiva. Se trata de un campo en continuo desarrollo gracias al avance incesante de la tecnología. Cada técnica se caracteriza por unas bases físicas específicas. Así, la ecografía se basa en la producción y detección de ultrasonidos, la tomografía computarizada (TC) en los rayos X y la resonancia magnética (RM) en la creación de campos magnéticos que modifican la alineación de los protones contenidos en los tejidos. La RM tiene muchas ventajas frente al TC, ya que tiene mayor resolución, mejor capacidad para diferenciar los tejidos y es muy versátil gracias a las diferentes secuencias que permiten estudiar con mayor precisión unos tejidos u otros. La ausencia de radiaciones ionizantes también constituye una ventaja. La ecografía también es una técnica no invasiva e inocua, sin embargo, a diferencia de la RM es explorador-dependiente y no permite estudiar musculatura profunda. Por todo ello, para el trabajo presentado en esta tesis, utilizamos técnicas de RM.

1.2.1. Resonancia magnética

Para entender el funcionamiento de la RM es necesario conocer algunas propiedades de las estructuras más elementales de la materia: los átomos, así como el concepto del electromagnetismo. A continuación, profundizaremos en las bases físicas de la RM, para entender

su funcionamiento y posteriormente centrarnos en su utilidad en el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades musculares.

1.2.1.1. Bases físicas

1.2.1.1.1. Concepto de espín nuclear

Toda la materia está compuesta por átomos, que a su vez están formados por tres tipos de partículas: electrones (con carga eléctrica negativa), protones (con carga positiva) y neutrones (sin carga). El átomo más sencillo es el Hidrógeno, formado por un protón y un electrón. Se trata, además, del más abundante en la naturaleza, ya que forma parte de la molécula de agua. El funcionamiento de la RM se basa fundamentalmente en la medida y cuantificación de los cambios de energía que sufren los átomos de hidrógeno (que forman parte de nuestro organismo) cuando se introducen en campos electromagnéticos. Para entender en qué consisten estos cambios es imprescindible conocer el concepto de “espín”, que es una característica intrínseca del átomo junto con la carga y la masa.

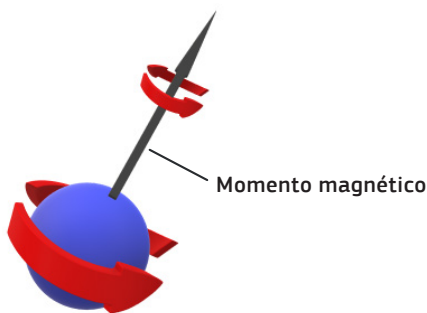


Figura 2.1: Representación esquemática del movimiento de rotación del átomo (espín)

El **espín** es el movimiento de giro sobre sí mismo que posee el átomo. Se representa mediante un vector orientado sobre el eje de giro (momento magnético) (*Figura 2.1*). Las cargas en movimiento generan campos magnéticos (de ahí la palabra “electroimán”, que es un imán que no tiene magnetismo intrínseco, como los materiales magnéticos, sino que este se genera a partir de cargas

eléctricas). Por lo tanto, el átomo de hidrógeno en movimiento da lugar a un campo magnético a su alrededor en la dirección de su espín.

En condiciones normales, los átomos de hidrógeno se disponen de forma aleatoria en el organismo, de forma que el campo magnético de unos se contrarresta con el de otros, dando lugar a un momento magnético global nulo. Sin embargo, si introducimos el organismo en

un campo magnético muy potente (en los esquemas representado como B_0), sus átomos se alinearán produciendo un vector magnético global (*Figura 2.2*).

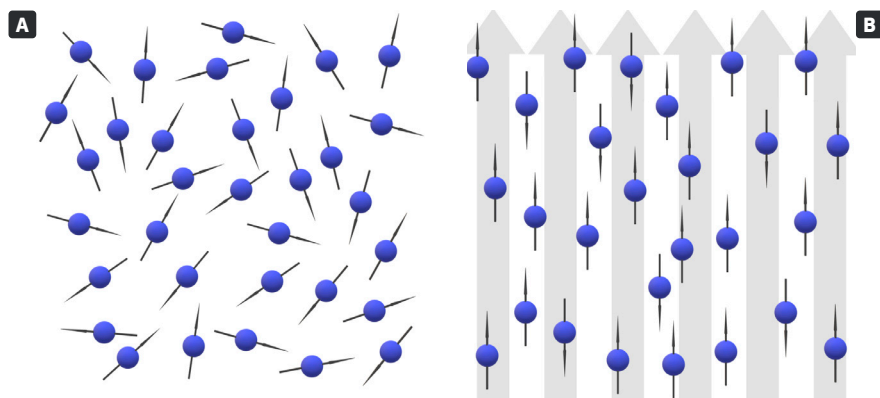


Figura 2.2: Disposición esquemática de los átomos de hidrógeno en ausencia (*A*) y en presencia de un campo magnético externo (*B*).

Aunque los espines se alineen en la dirección del campo magnético, no todos lo hacen en el mismo sentido: la mayoría seguirán el sentido del campo (se dice que están en **estado paralelo**, que es el estado de menor energía), pero una minoría se alinearán en sentido contrario (en **estado antiparalelo** o estado de mayor energía).

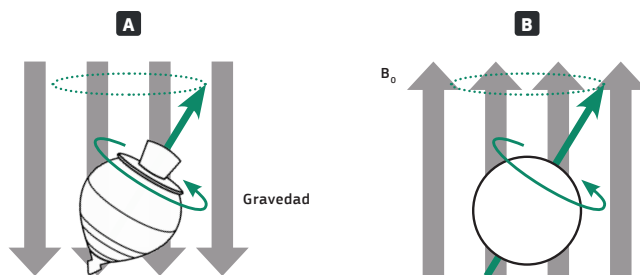


Figura 2.3: Representación del movimiento de precesión del átomo.

A: Movimiento de giro de una peonza alrededor del vector de la fuerza de la gravedad.

B: Movimiento análogo del átomo, en torno al eje del campo magnético B_0 .

Además del movimiento rotatorio (en inglés *spinning*), los átomos sometidos a un campo magnético realizan un movimiento de giro alrededor del eje del campo magnético, de tipo cónico, del mismo modo que una peonza gira sobre un eje en la dirección de la fuerza de la gravedad.

Este movimiento se llama **precesión** (*Figura 2.3*). La frecuencia de precesión del átomo es proporcional a la intensidad del campo magnético, y se denomina **frecuencia de Larmor**.

$$f = \frac{\gamma \cdot B}{2 \cdot \pi} \quad f = \text{Frecuencia. } B = \text{campo magnético. } \gamma = \text{constante giromagnética}$$

Dentro del espectro electromagnético, la frecuencia de Larmor se encuentra en el rango de la radiofrecuencia.

Los átomos paralelos y antiparalelos se encuentran también en un movimiento de precesión no sincronizado, por lo que el vector de dicho movimiento tendrá tres componentes en el espacio: una en el eje del campo magnético (por consenso eje Z) y otras dos en el plano XY. Como estos átomos están alineados con el campo magnético, obtendremos un vector magnético global en el eje Z, mientras que las componentes del plano XY de los distintos átomos se anularán unas a otras, de forma que no habrá vector global en el plano XY (*Figura 2.4*).

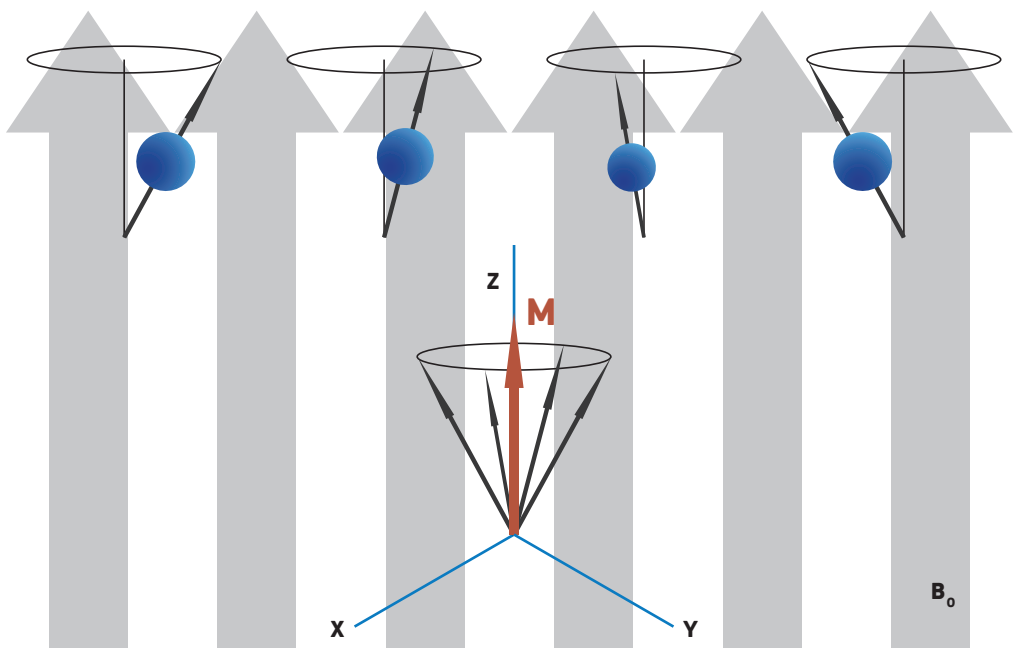


Figura 2.4: Representación gráfica del vector magnético resultante en el eje Z, como consecuencia de la suma de los vectores de todos los momentos magnéticos.

B_0 : Campo magnético principal. M : Vector de magnetización global

Dicho esto, imaginemos que tenemos nuestra muestra dentro del campo magnético, con la mayoría de sus átomos orientados en sentido paralelo y precesando a la frecuencia de Larmor. Es posible cambiar el estado energético de los átomos haciéndolos pasar del sentido paralelo al antiparalelo. Para ello hay que excitarlos con la energía de un fotón ($E=h\cdot\gamma$), utilizando una frecuencia igual a la frecuencia de precesión del átomo (es decir, la frecuencia de Larmor). La adquisición de las secuencias de RM se basa en ser capaces de detectar la energía que emiten los átomos al volver a la situación de reposo tras haber sido estimulados con un pulso de radiofrecuencia (fenómeno de relajación nuclear)^{14,15}.

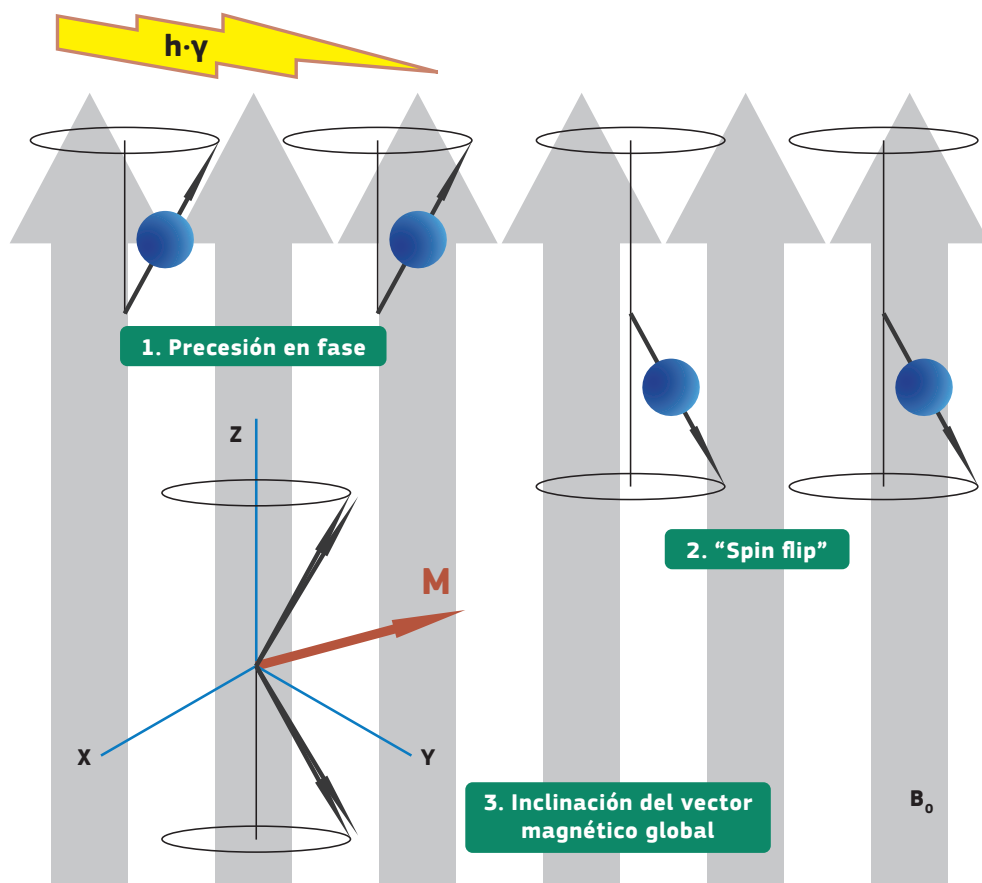


Figura 2.5: Proceso de excitación nuclear y fenómeno de Resonancia.

Cuando los átomos absorben un pulso de radiofrecuencia comienzan a precesar en fase, algunos espines pasan del estado paralelo al antiparalelo ("spin flip") y como consecuencia el vector de magnetización global se inclina. B_0 : Campo magnético principal. M : Vector de magnetización global.

1.2.1.1.2. Excitación y relajación nuclear

Cuando aplicamos esta energía, el átomo la absorbe en lo que se conoce como el **fenómeno de resonancia**. Es el mismo fenómeno que sucede cuando una cantante de ópera rompe una copa al cantar en la frecuencia de resonancia del cristal.

Al absorber dicha energía suceden dos cosas: **1.** Los átomos comienzan a precesar de forma sincronizada (en fase) y **2.** Algunos espines del estado paralelo pasan a antiparalelo (*spin flip*). El resultado es que el vector de magnetización global (M) se inclina, produciendo, ahora sí, un componente en el plano XY. Este proceso se denomina “excitación por pulso de radiofrecuencia” (*Figura 2.5*).

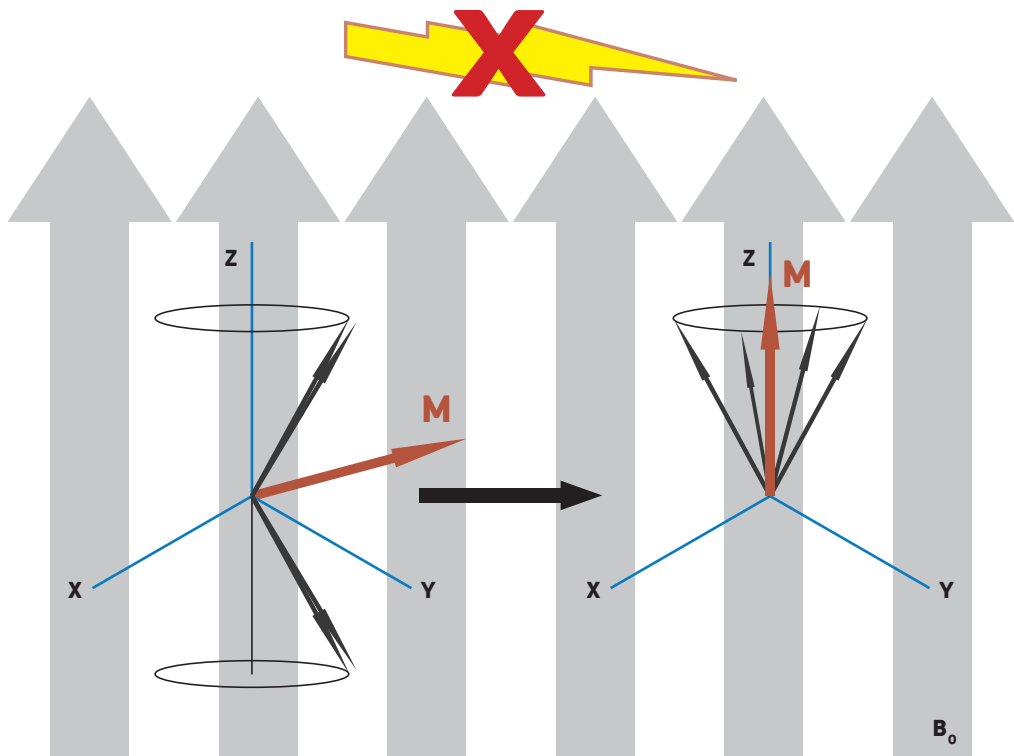


Figura 2.6: Fenómeno de relajación nuclear. Al cesar el pulso de radiofrecuencia los espines en estado antiparalelo se invertirán y además dejarán de precesar en fase. Como consecuencia el vector de magnetización global (M) volverá a su estado inicial.

Cuando cesamos el pulso de radiofrecuencia, los átomos volverán a su situación de menor energía. Este proceso se llama **relajación nuclear** (*Figura 2.6*). Durante este proceso se emite la energía

que será utilizada para formar las imágenes de RM. Del mismo modo que hemos dividido el proceso de excitación en dos vertientes, podemos diferenciar dos tipos de relajación: relajación longitudinal, por la que los átomos que están en estado antiparalelo volverán al paralelo, y relajación transversal, por la que los átomos dejan de precesar en fase. Estos procesos suceden de forma simultánea, pero son más fáciles de comprender explicándolos de forma independiente.

Relajación longitudinal (T1)

El tiempo que tardan los átomos en pasar del estado antiparalelo al paralelo cuando cesa el pulso de radiofrecuencia varía en función del tejido.

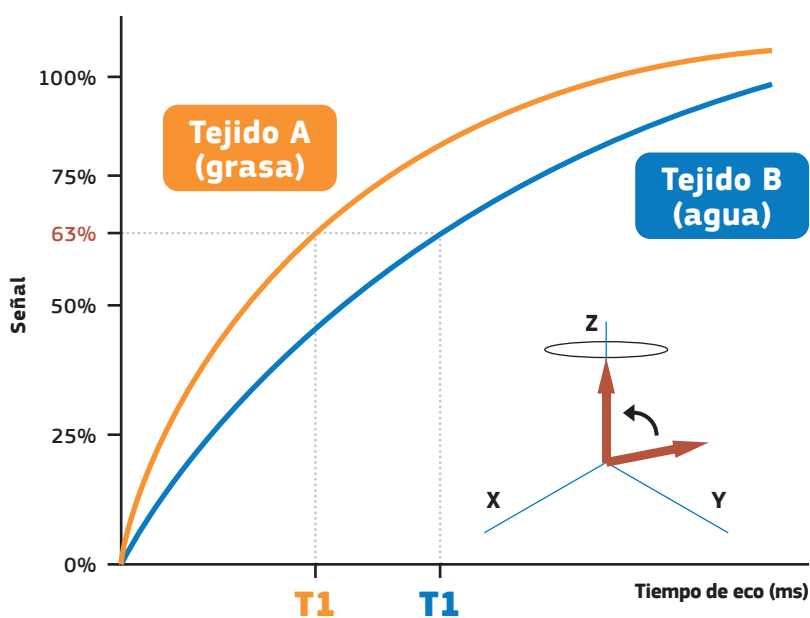


Figura 2.7: Representación gráfica del proceso de relajación longitudinal para dos tejidos diferentes (agua y grasa)

T1 es el tiempo que tarda la magnetización en recuperar un 63 % de su valor inicial. Como vemos en la **Figura 2.7**, tejidos con una velocidad de relajación en el plano longitudinal más rápida tendrán un T1 más corto. Este es el caso de la grasa. Inversamente, tejidos que tardan más en relajarse tendrán T1 más largo, como es el caso del agua.

Relajación transversal (T2)

El tiempo que tardan los átomos en perder la sincronización de precesión también varía en función del tejido. A medida que el vector magnetización regresa a su posición su componente en el plano XY se irá reduciendo, así como la señal que obtenemos como resultado del proceso. El tiempo que tiene que transcurrir para que la magnetización transversal pierda un 63 % de su valor tras el pulso de radiofrecuencia es T2 (*Figura 2.8*). Los tejidos más homogéneos, como es el caso del agua, pierden la señal más lentamente (tienen por tanto un T2 largo).

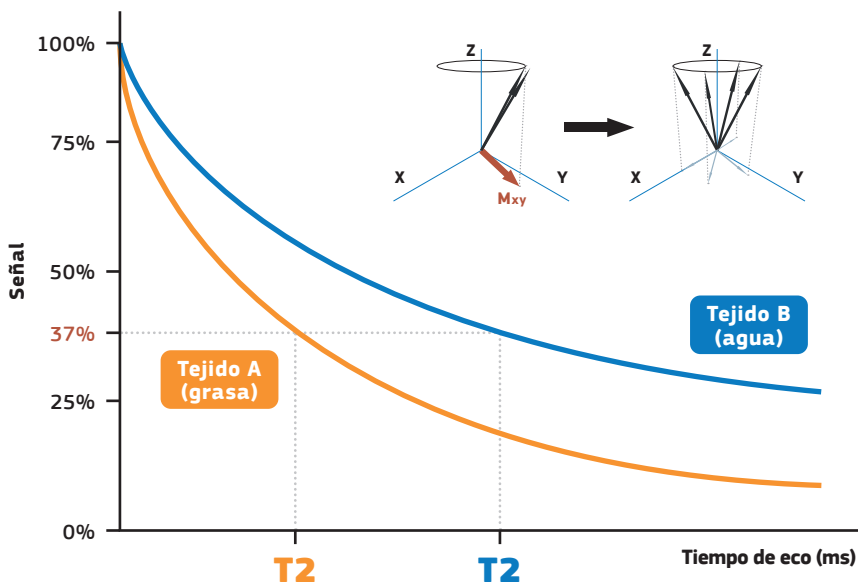


Figura 2.8: Representación gráfica del proceso de relajación transversal para dos tejidos (agua y grasa). El agua es un tejido más homogéneo por lo que tiene un tiempo T2 más largo.

1.2.1.1.3. Potenciación en T1 y T2

Todas las imágenes obtenidas mediante RM contienen un componente T1 y otro T2, pero podemos ajustar los parámetros de la máquina para que la imagen tenga predominio en T1 (potenciación en T1) o en T2 (potenciación en T2).

Potenciación en T1

Si en lugar de un solo pulso de radiofrecuencia se emiten varios, separados entre sí un tiempo determinado (“tiempo de repetición” o “TR”), ajustando dicho tiempo se puede llegar

a conseguir que la relajación longitudinal sea diferente para distintos tejidos. Aquellos con un T1 más largo no habrán tenido ocasión de llegar a la relajación longitudinal total, por lo que, al recibir un nuevo pulso, tendrán menor cantidad de núcleos relajados disponibles para recibir el siguiente pulso de radiofrecuencia. Debido a ello emitirán menor señal que la procedente de los tejidos con mayor número de protones relajados dispuestos a ser excitados de nuevo. Cuanto menor es el TR, menor el número de núcleos que habrán podido relajarse y menor señal. Si se emplea un TR fijo entre los pulsos de radiofrecuencia, un tejido con un T1 corto tendrá mayor señal que un tejido con un T1 largo. Por lo tanto, las imágenes potenciadas en T1 se consiguen ajustando un TR y un “tiempo de eco” (ver a continuación) corto (*Figura 2.9A*).

Potenciación en T2

El tiempo que transcurre desde que se envía el pulso de radiofrecuencia hasta que se recoge la señal de los núcleos excitados al relajarse se denomina «tiempo de eco» (TE). Mediante un TE largo se obtienen imágenes potenciadas en T2, ya que es este valor el que marcará la diferencia entre los dos tejidos (*Figura 2.9B*).

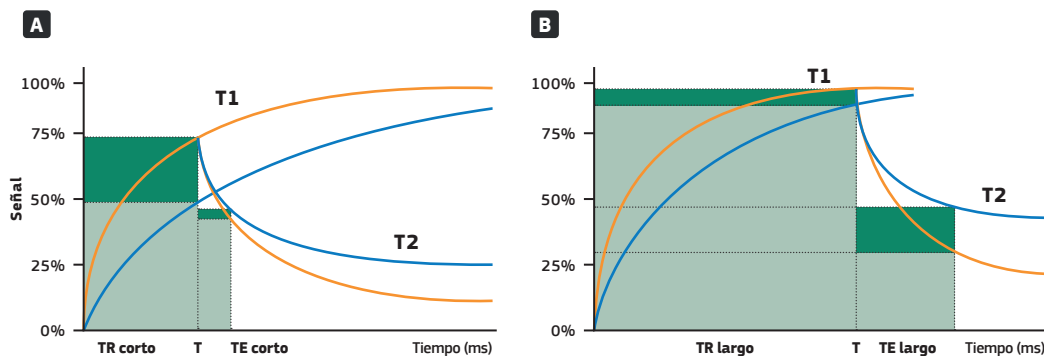


Figura 2.9: *A:* Potenciación en T1. Ajustando un TR y un TE corto, se consigue una imagen potenciada en T1, ya que es este valor el que produce un mayor contraste entre los tejidos. *B:* Potenciación en T2. Mediante un TR y un TE largos se consigue una imagen potenciada en T2, ya que es este valor el que genera mayor contraste.
TR: Tiempo de repetición. **TE:** Tiempo de eco

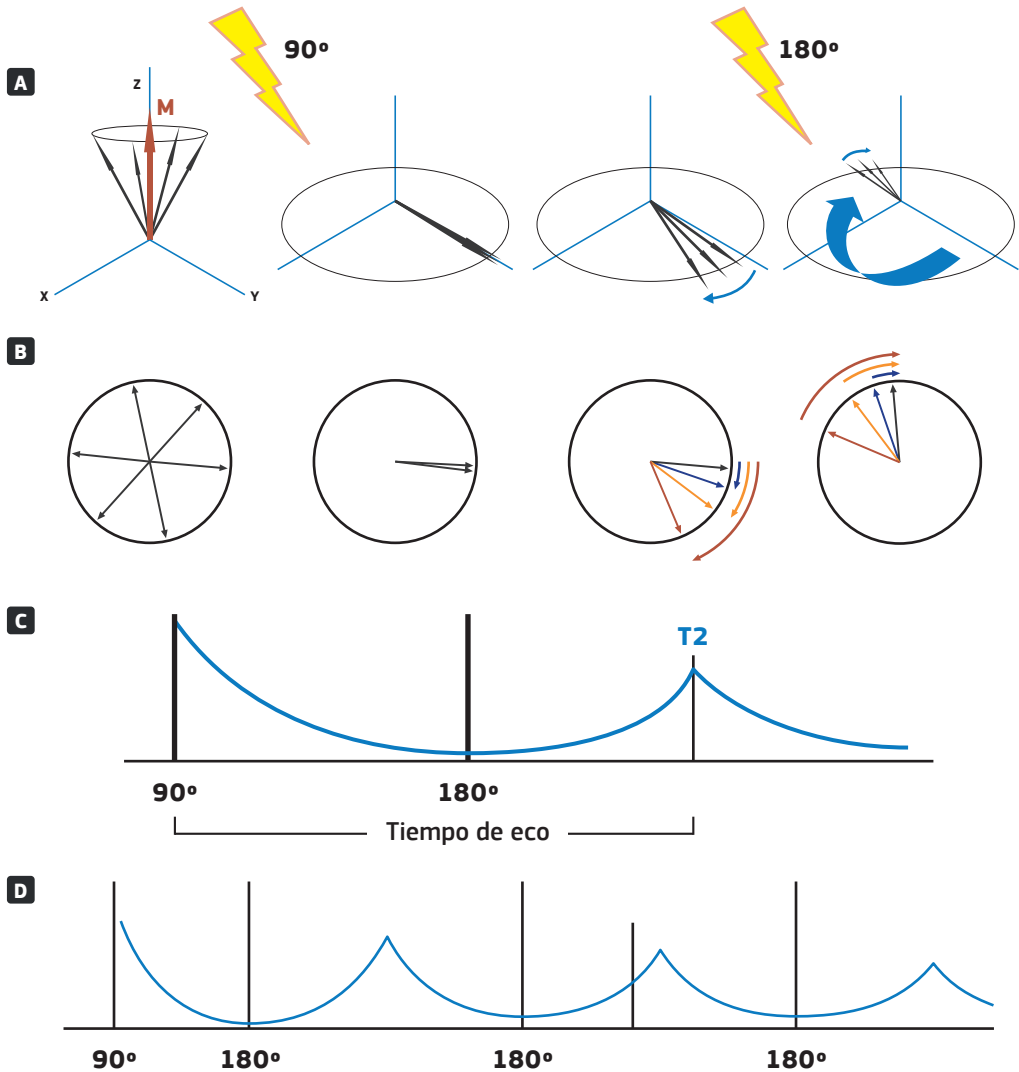


Figura 2.10: Esquema de la obtención de imágenes espín-eco.

Tras el pulso de radiofrecuencia de 90° los espines se alinean en el plano XY, pero debido a las irregularidades del campo magnético, comienzan a perder la precesión en fase. Si en ese momento aplicamos un pulso de 180° , se invertirán. Puesto que los espines que precesaban a mayor velocidad se encuentran ahora más atrasados, tras un tiempo volverán a precesar en fase, obteniéndose una señal de eco máxima (T2).

A: Representación en los tres ejes del espacio. **B:** Representación en el plano XY. **C:** Representación de la señal obtenida respecto al tiempo. **D:** Si se aplican más pulsos de 180° se obtendrán más ecos.

1.2.1.3. Técnicas convencionales

Las “secuencias de adquisición” son la combinación de pulsos de radiofrecuencia y gradientes de campo magnético que se aplican de forma secuencial con el objetivo de obtener una imagen

en la que podamos distinguir los diferentes tejidos (esto es, que exista suficiente contraste entre los mismos). Existen multitud de técnicas y sus aplicaciones están en constante expansión. Aquí detallaremos solo las más importantes para comprender el funcionamiento de la RM ¹⁵⁻¹⁷.

1.2.1.3.1. Secuencia espín-eco

Consiste en la aplicación de un pulso de radiofrecuencia capaz de inclinar el eje de magnetización 90° (pulso de 90°) seguido de un pulso de 180° . Nos permite obtener imágenes potenciadas en T2. La base de su funcionamiento es la siguiente:

Como explicamos con anterioridad, al aplicar un pulso de radiofrecuencia sobre la muestra, sus espines comienzan a precesar en fase. Sin embargo, debido a irregularidades del campo magnético (que son inevitables en todos los equipos de resonancia), dichos espines comienzan a precesar a distintas velocidades y pierden rápidamente la sincronización. Si en ese momento aplicamos otro pulso, esta vez de 180° , los espines se invertirán (en el plano XY), ahora los más rápidos se encontrarán más atrasados, pero tras un tiempo volverán a precesar en fase, produciendo una señal máxima (eco), tras la cual volverán a caer fuera de fase. Si volvemos a enviar pulsos de 180° , obtendremos más ecos (**Figura 2.10**).

1.2.1.3.2. Secuencia de inversión-recuperación o inversion recovery (STIR, FLAIR)

En la secuencia de inversión-recuperación el ciclo de pulsos comienza con un pulso de radiofrecuencia de 180° , en lugar de 90° . Con ello se consigue invertir el sentido de los espines, que pasan al estado antiparalelo, con lo que la magnetización cambia de sentido en el eje longitudinal. De esta forma, el tiempo de relajación longitudinal se aumenta (ya que el vector magnetización tiene que pasar de 180° a 0° en lugar de partir de 90°), y, además, en un determinado momento el vector será completamente transversal al eje Z, por lo que su valor en dicho eje será nulo (en el momento que el número de espines orientados en sentido paralelo iguale a los orientados en antiparalelo). Este momento puede aprovecharse para anular la señal de determinados tejidos. Por ejemplo, si aplicamos una secuencia de adquisición en el momento que la grasa (que recordemos tiene un T1 corto) ha recuperado

la magnetización hasta el valor nulo, obtendremos una imagen sin señal grasa, es decir, un STIR o *Short Time Inversión Recovery* (**Figura 2.11**).

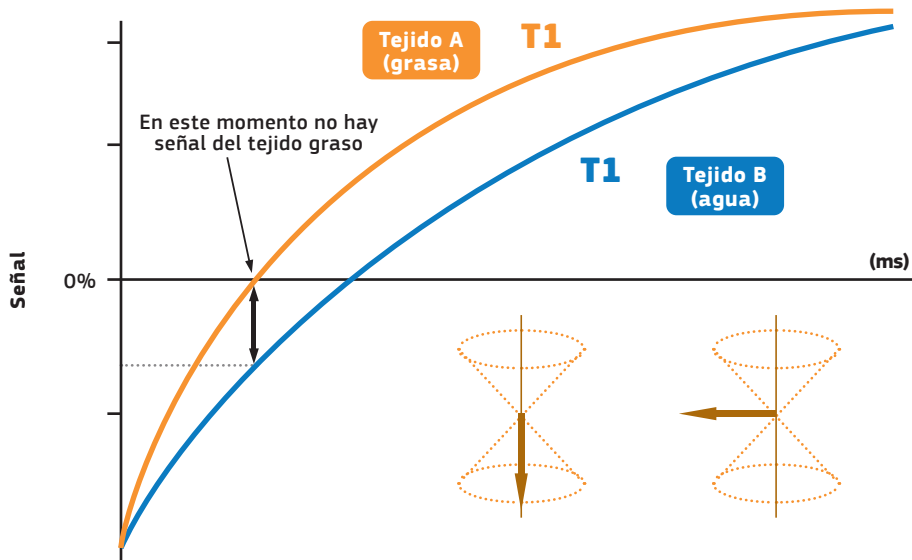


Figura 2.11: Representación esquemática de la magnetización tras el pulso de inversión de 180° y la recuperación de dos tejidos con distinto T1. Hay un punto en el que la señal de uno de los tejidos es nula, y por lo tanto se puede utilizar para suprimir ese tejido de la imagen.

Si, por el contrario, adquirimos la imagen tras un T1 largo, podemos anular tejidos como el líquido cefalorraquídeo. Esta secuencia se denomina *FLAIR* o *Fluid Attenuated Inversión Recovery*.

1.2.1.3.3. Secuencia de eco por gradiente

Las secuencias de eco por gradiente se desarrollaron por la necesidad de acortar el tiempo de exploración. Se basan en reducir los TR. Para ello utilizan pulsos de radiofrecuencia menores de 90° , con lo que la relajación nuclear es más rápida. Otra diferencia fundamental de estas secuencias es que, para la obtención de ecos no utiliza pulsos de 180° , como el espín-eco, sino que aplica gradientes magnéticos (producidos mediante las bobinas de gradiente). Estas secuencias son muy versátiles, ya que en función del ángulo (*flip angle*) y los gradientes utilizados existen infinidad de secuencias posibles. Modificando dichos parámetros, junto con el TR y el TE, pueden obtenerse imágenes potenciadas en T1 o T2.

1.2.1.4. Técnicas avanzadas

1.2.1.4.1. Dixon

En 1984 Thomas Dixon describió una técnica que, utilizando secuencias de espín-eco, permitía crear imágenes separadas de agua y grasa, y que se denominaría posteriormente 2-punto-Dixon¹⁸. El gran interés en esta técnica reside en que, no solo es capaz de visualizar por separado ambas sustancias, sino que también permite la cuantificación del contenido graso.

Obtener imágenes de grasa y agua es posible gracias a que sus átomos precesan a velocidad diferente. El procedimiento 2-punto Dixon se basa en la adquisición de imágenes en dos momentos concretos: cuando los vectores magnéticos de los átomos de agua y grasa se encuentran alineados (en fase o *in phase*), y cuando se encuentran en sentidos opuestos, a 180° (fuera de fase o *out of phase*). Sumando estas dos imágenes se obtiene una tercera solo de agua y, restándolas, una cuarta solo de grasa (**Figura 2.12**).

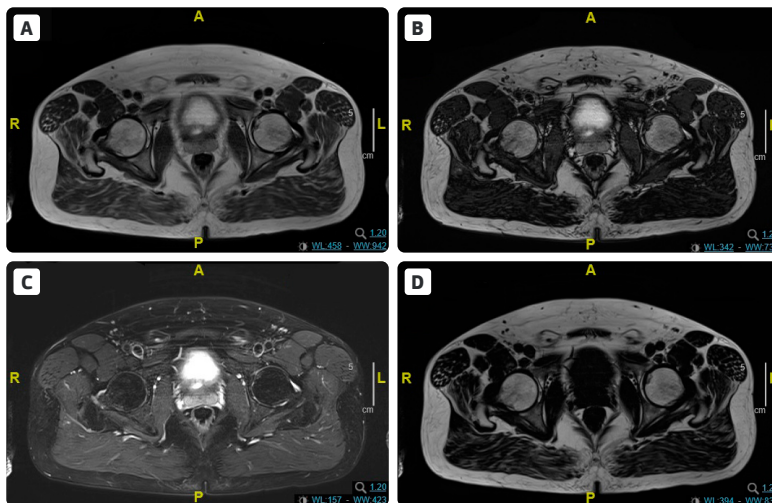


Figura 2.12: Adquisición 2-punto Dixon de la zona pélvica.
Con imágenes in phase (A), out of phase (B), de agua (C) y de grasa (D).

Debido a la falta de homogeneidad del campo magnético, las imágenes obtenidas de agua y grasa pueden variar en función del paciente o su posición en la máquina, haciendo que la precisión en la cuantificación del contenido graso varíe. Una solución para este problema consiste en utilizar más ecos para obtener la imagen (técnicas 3-punto-Dixon y 4-punto-Dixon)¹⁹.

1.2.1.4.2. Espectroscopia

Todas las secuencias de las que hemos hablado hasta ahora están basadas en la captación de la energía producida por los átomos de hidrógeno en respuesta a pulsos de radiofrecuencia. Aunque este hidrógeno se encuentra mayoritariamente en las moléculas de agua, también es un componente fundamental de la mayoría de moléculas del organismo. La espectroscopia es una técnica mediante la cual, en lugar de formar una imagen a partir de la energía emitida por los átomos, buscamos la frecuencia a la que entran en resonancia moléculas menos abundantes. Para observar el espectro de frecuencias de los elementos minoritarios es fundamental suprimir la señal de agua (por ejemplo, mediante una secuencia de inversión recuperación), puesto que de otra forma su espectro ocultaría el de las demás moléculas.

La energía captada es tan pequeña que no permite la formación de imágenes, pero sí nos permite obtener una gráfica en cuyo eje Y se representa la intensidad de la señal y en el X, las frecuencias de resonancia. Como cada elemento tiene una frecuencia de resonancia característica, podemos conocer la composición de la muestra. Para ello debemos de centrar el análisis en un vóxel específico.

Existen técnicas de espectroscopia de otros átomos distintos al hidrógeno, ya que este no es el único capaz de entrar en resonancia (cualquier átomo con un espín distinto de cero podría hacerlo). Aunque su cantidad es ínfima en comparación con la del hidrógeno, es posible realizar espectroscopia del átomo de fósforo-31 (^{31}P , utilizado para estudios de metabolismo energético) y del carbono-13 (^{13}C , prometedor para el estudio de enfermedades por acúmulo de glucógeno). Sin embargo, estas técnicas se encuentran en fase de investigación y todavía no tienen aplicación clínica^{15,19,20}.

1.2.1.4.3. Difusión

Las secuencias potenciadas en difusión se basan en la captación y cuantificación del movimiento de las moléculas de agua. Si estas pueden circular libremente, lo harán de forma aleatoria en las tres direcciones del espacio (difusión isotrópica). Sin embargo, si se encuentran

en un continente (por ejemplo, el agua contenida en las células musculares o nerviosas), tenderán a desplazarse mayoritariamente en una dirección (difusión anisotrópica).

Las técnicas basadas en la difusión permiten detectar el daño muscular, por lo que se está investigando su posible uso en miopatías inflamatorias, distrofias musculares y enfermedad de Pompe ^{15,19,21}.

1.2.1.4.4. *Perfusión*

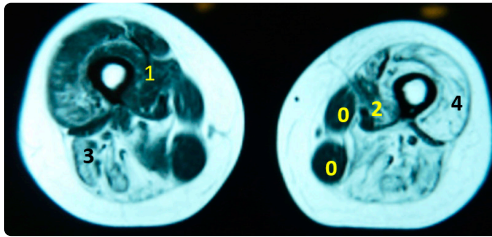
Las técnicas de perfusión permiten medir el flujo sanguíneo del tejido. A nivel muscular, esto permite diferenciar procesos inflamatorios, en los que la vascularización se encuentra aumentada, de procesos degenerativos.

1.2.1.5. *Aplicación al estudio de miopatías hereditarias*

Las técnicas convencionales de RM nos permiten de forma no invasiva visualizar cambios en la estructura muscular: atrofia o hipertrofia, inflamación y sustitución por tejido graso. Puesto que estos cambios son característicos de las miopatías hereditarias, la RM es una herramienta muy útil tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de estas enfermedades.

Desde que en los primeros estudios de imagen muscular (mediante TC) se observara que los músculos se afectaban de forma desigual en distintas distrofias musculares, se planteó la posibilidad de identificar patrones de afectación distintivos para cada enfermedad. Con la generalización del uso de la RM en la atención clínica, comenzaron a publicarse series de casos de pacientes con afectación muscular común y, gracias a estudios de colaboración multicéntricos, se han descrito cohortes grandes de pacientes con miopatías de baja prevalencia ^{22,23,32-39,24-31}. Estos patrones son de gran importancia diagnóstica, ya que permiten diferenciar enfermedades que presenten un fenotipo común. Se han publicado diversas revisiones con el objetivo de ayudar al clínico en el diagnóstico diferencial de estos patrones ⁴⁰⁻⁴⁴. Además, se han propuesto sistemas de inteligencia artificial, lo cual supone una herramienta muy prometedora para el futuro ^{45,46}.

Para cuantificar el grado de infiltración grasa en secuencias convencionales como las potenciadas en T1, se han descrito varias escalas semicuantitativas, que gradúan los músculos en función del contenido de grasa^{37,38,47} (**Figura 2.13**).



Escala modificada de Fisher

0 = Apariencia normal

1 = Leve: Trazas de aumento de intensidad de señal

2 = Moderado: Trazas confluyentes, afectando a menos del 50% del músculo

3 = Grave: Aumento de la intensidad de la señal en más del 50% del músculo

4 = Terminal: Reemplazo completo del músculo

Figura 2.13: Escala modificada de Fisher para la cuantificación visual del contenido de grasa muscular.

Si bien estas escalas son útiles para estimar el contenido de grasa y definir los patrones de afectación muscular, no son suficientemente sensibles para estimar cambios en periodos cortos de tiempo. Por ello, para los estudios de seguimiento, las técnicas cuantitativas como el 2 y 3-punto-Dixon han ganado popularidad⁴⁸⁻⁵⁷. Sin embargo, la cuantificación del contenido de grasa a partir de las imágenes Dixon no se obtiene de forma automática, sino que el explorador debe señalar el área de interés en el post-procesado de las imágenes, mediante un software específico. Para delimitar esta área deben dibujarse regiones de interés (*regions of interest* o ROIs) en las secciones del músculo. El programa nos dará el porcentaje de grasa (*fat fraction* o FF) así como el área de la zona dibujada (**Figura 2.14**).

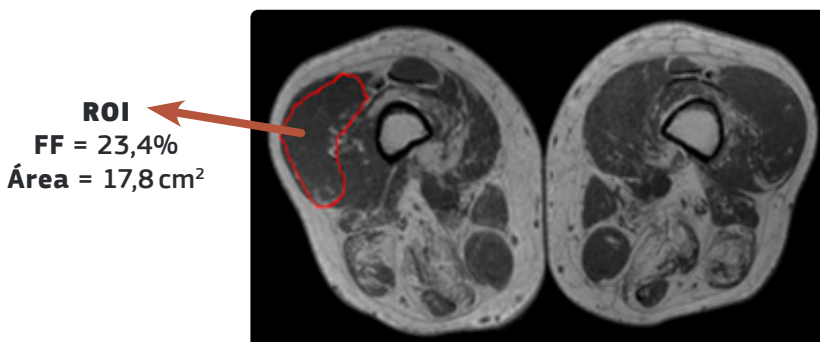


Figura 2.14: Área de interés dibujada manualmente sobre el músculo vastus lateralis en la imagen en fase en la secuencia 2-punto Dixon.

ROI: region of interest. **FF:** Fat Fraction

1 INTRODUCCIÓN

Este proceso es laborioso, y en función del número de músculos que se quieran analizar, puede requerir mucho tiempo. No hay consenso sobre la mejor manera de realizar este análisis. La mayoría de estudios dibujan ROIs sobre cada uno de los músculos y luego calculan la FF total del muslo (o de la zona anatómica que se esté estudiando)^{54,56,58-61}. Otros estudios han realizado un análisis más global, agrupando varios músculos con el mismo ROI^{50,51,62-64}. Conscientes de la gran demanda de tiempo de este análisis, algunos profesionales abogan por identificar el músculo más útil para el seguimiento de cada miopatía, teniendo en cuenta el ritmo natural de progresión de la enfermedad para cada músculo^{28,52}. Tampoco hay consenso sobre el número de secciones que deben analizarse para obtener la medida más precisa, pero parece sensato pensar que, puesto que algunas miopatías presentan un gradiente de afectación de distal a proximal o viceversa, es necesario analizar los músculos a diferentes niveles. En los estudios de seguimiento es de vital importancia realizar el análisis en la misma sección muscular en cada momento temporal, ya que de otra forma la variación en el contenido graso no sería comparable. Esto añade todavía más tiempo al proceso de análisis.

Desde hace años se están intentando diseñar herramientas para realizar este análisis de manera automática, y aunque recientemente se han desarrollado softwares que llevan a cabo el proceso de forma semiautomática (el explorador dibuja una serie de ROIs y el programa lo generaliza al resto del músculo), todavía no se ha generalizado su uso^{65,66}.

Las miopatías hereditarias son enfermedades que evolucionan a lo largo de los años. Aunque se presupone un daño muscular continuo y progresivo, los pacientes suelen experimentar la pérdida de funcionalidad de forma escalonada. Es por ello que las pruebas y escalas funcionales utilizadas para el seguimiento pueden permanecer estables durante varios años. Por este motivo, disponer de herramientas que nos permitan detectar cambios en la estructura muscular en periodos cortos de tiempo es esencial para evaluar el efecto de intervenciones terapéuticas. De ahí la importancia del desarrollo de técnicas de RM capaces de monitorizar estos cambios.

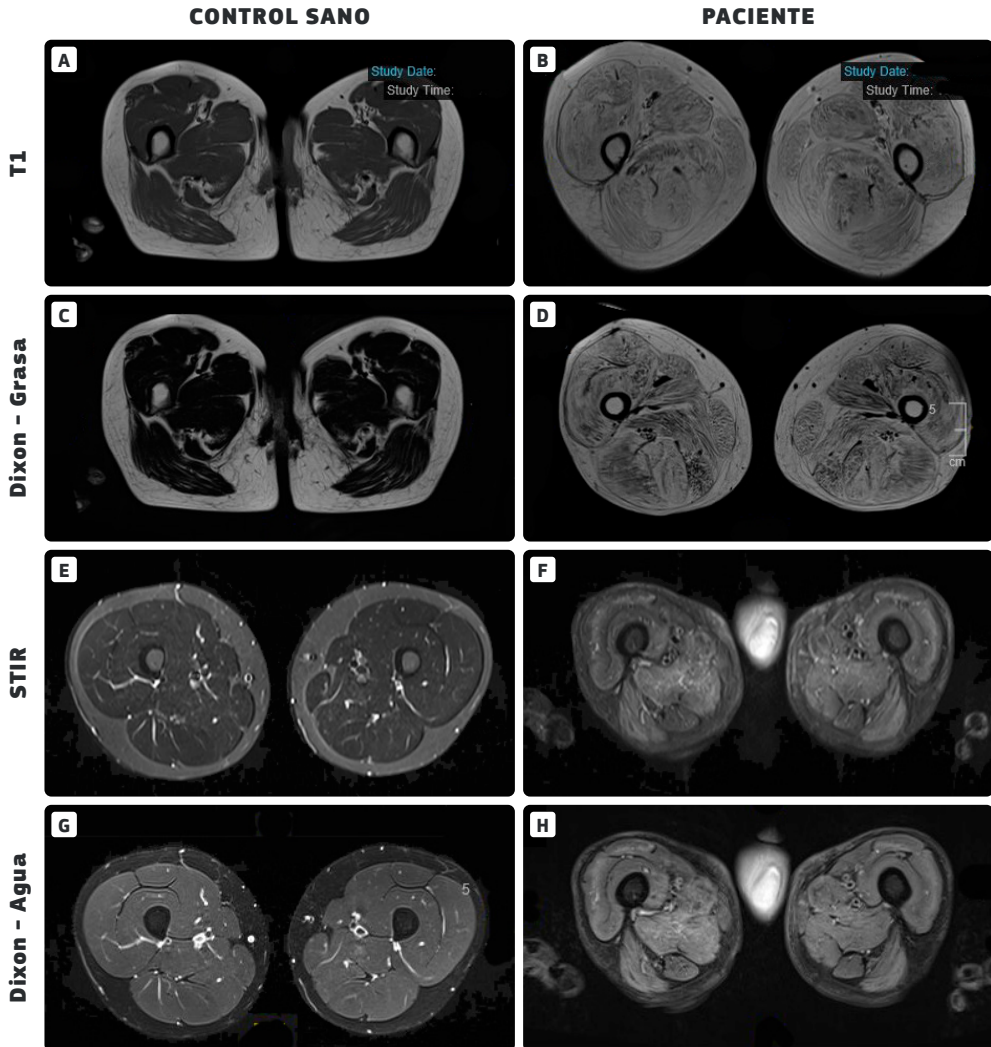


Figura 2.15: Secuencias más utilizadas en la resonancia magnética muscular.

Las imágenes de la izquierda corresponden a controles sanos, y las de la derecha pacientes con algún tipo de miopatía. Los pares de imágenes A y C, B y D, E y G y F y H son secuencias distintas a la misma altura del muslo en el mismo paciente.

Aunque no hay protocolos estandarizados para la adquisición de imágenes en pacientes con enfermedades neuromusculares, el grupo de estudio de RM de la red de centros de referencia europeos en enfermedades neuromusculares (*European Reference Network*) estableció una serie de recomendaciones durante su reunión en 2019 en los Países Bajos⁶⁷. Este panel de expertos recomienda realizar RM de cuerpo entero siempre que sea posible.

En cuanto a las secciones, para valorar los miembros y el tronco recomiendan secciones axiales, mientras que para valorar la cintura escapular aconsejan adquirir también secciones coronales. En relación a las secuencias, para la cuantificación de grasa recomiendan el uso de técnicas Dixon siempre que sea posible, y en su ausencia, técnicas potenciadas en T1. Para evaluar la inflamación y edema, recomiendan secuencias T2 con saturación grasa y STIR (**Figura 2.15**). Si existen alteraciones cognitivas, se recomienda realizar también RM cerebral, para identificar malformaciones, leucodistrofia u otras alteraciones asociadas fundamentalmente a distrofias musculares congénitas.

La investigación en el campo de la RM para el estudio de miopatías hereditarias sigue avanzando con la descripción incesante de nuevas técnicas y aplicaciones. Algo que hemos aprendido en estos años es la importancia de la colaboración entre diversos centros y países. La mayoría de las miopatías hereditarias tienen una prevalencia muy baja y por ello, para reclutar cohortes grandes de pacientes que permitan la realización de estudios de mayor calidad, es fundamental la cooperación. Con este objetivo se ha creado recientemente la plataforma “Myo-share” (<https://myo-share.ohri.ca/>), para facilitar la compartición de imágenes entre profesionales, respetando las leyes de todos los países y garantizando el anonimato de los pacientes.

1.2.2. Otras técnicas

1.2.2.1. Ecografía

La ecografía es una técnica coste-efectiva y no invasiva. Permite apreciar cambios en el trofismo y la arquitectura muscular, así como obtener imágenes dinámicas en tiempo real¹⁹.

Su funcionamiento se basa en la emisión de ultrasonidos que, al alcanzar los tejidos, son reflejados y capturados de nuevo por el transductor. Estos “ecos” (que varían en función del tipo de tejido) son interpretados por un *software* creando las imágenes que se observan en la pantalla del ecógrafo.

Permite diferenciar el tejido muscular sano, más hipoeoico, del patológico, que se visualiza más grisáceo debido al contenido de grasa y fibrosis. En las distrofias musculares el patrón

suele ser difuso, mientras que en los trastornos neurógenos tiene un aspecto apollado (*figura 2.16*).

La ecografía se ha utilizado como screening diagnóstico de enfermedades musculares, para la identificación de un músculo adecuado para biopsiar, como herramienta guía para infiltración con toxina botulínica de músculos hipertónicos y se está explorando su utilidad como herramienta de seguimiento⁷².

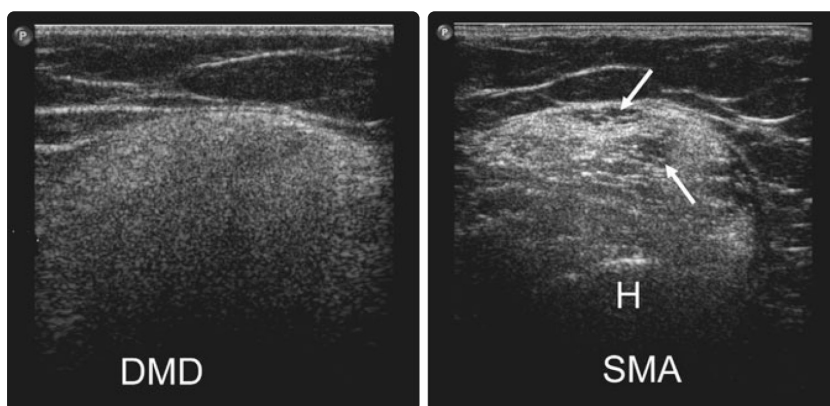


Figura 2.16: Imagen ecográfica transversal del bíceps brachii en un paciente con DMD (*izquierda*) y con atrofia muscular espinal (SMA) (*derecha*).

En ambas imágenes la intensidad del eco está incrementada y se aprecia una pérdida de arquitectura muscular. En la DMD, la intensidad del eco se encuentra incrementada de una forma homogénea, mientras que en la SMA se aprecia un patrón apollado. Las fibras atroficas se visualizan como puntos blancos mientras que las hipertróficas aparecen en áreas negras (*flechas*). **DMD:**

Distrofia muscular de Duchenne. **SMA:** Atrofia muscular espinal. **H:** húmero.

Imagen de "Neuromuscular Imaging", pag 16²⁴.

1.2.2.2. Tomografía Computarizada

La tomografía computarizada (TC) empezó a utilizarse para el diagnóstico de enfermedades musculares a final de la década de los 70 y principio de los 80. Sin embargo, con el desarrollo de las técnicas de RM en los años 90, el papel de la TC en el estudio de estas enfermedades se redujo considerablemente. Debido a la mayor resolución de la RM y a la ausencia de radiaciones ionizantes, el TC ha quedado relegado a aquellas circunstancias en las que la RM está contraindicada (pacientes portadores de implantes no compatibles con la resonancia).

En las imágenes de TC el tejido graso es más hipodenso que el músculo sano, lo que permite identificar los músculos afectados. Las técnicas híbridas de TC y tomografía por emisión de positrones (PET, de sus siglas en inglés) tienen valor diagnóstico añadido para procesos inflamatorios y neoplásicos.

1.3. DISTROFINOPATÍAS: ENFERMEDADES DE DUCHENNE Y BECKER

El segundo artículo incluido en esta tesis es un trabajo de investigación llevado a cabo en pacientes con enfermedades de Duchenne (DMD) y Becker (BMD), también conocidas como distrofinopatías.

Las distrofinopatías conforman un espectro de enfermedades musculares ocasionadas por mutaciones en el gen *DMD*, el cual se encuentra en el cromosoma X, por lo que se trata de una enfermedad generalmente padecida por hombres y transmitida por mujeres. A pesar de ello y contrariamente a la creencia extendida de que se trata de una enfermedad exclusiva del sexo masculino, un porcentaje de mujeres portadoras son sintomáticas con fenotipos muy variables. Se trata de una de las enfermedades neuromusculares más frecuentes en la población, con una prevalencia mundial estimada de 2.9 por 10000 varones nacidos para la DMD y 0.5 por 10000 para la BMD⁷³.

El *DMD* es el gen más largo del genoma humano, hecho que constituye una de las dificultades para el desarrollo de terapias génicas. Codifica la proteína distrofina, que se expresa en músculo esquelético y cardíaco, y en neuronas corticales y cerebelosas. En el músculo esquelético la distrofina establece una conexión entre el aparato contráctil (por medio de la unión a la actina) y la matriz extracelular (a través del complejo distrofina-glicoproteína), cumpliendo un papel principal en la estabilización de la membrana celular (**Figura 1.1**).

Cuando la mutación del gen *DMD* altera el marco de lectura del RNA mensajero, se produce un truncamiento precoz de la proteína, produciendo una distrofina no funcional que, en la mayoría de los casos, es degradada por la célula. En estos casos el fenotipo resultante es la DMD. En

contraste, cuando la mutación respeta el marco de lectura, se produce una distrofina de menor tamaño, pero con cierta funcionalidad, lo que conduce al fenotipo de la BMD. Las mutaciones más frecuentes son las deleciones, seguidas por las duplicaciones y, por último, las mutaciones puntuales. A pesar de esta división clásica en DMD y BMD, en los últimos años están aumentando las evidencias de un fenotipo intermedio, en el que, debido presumiblemente a modificadores genéticos, pacientes cuya mutación predeciría un fenotipo de DMD, mantienen la marcha más allá de los 12 o 14 años, lo cual no es esperable en el fenotipo clásico⁷⁴.

1.3.1. Distrofia muscular de Duchenne

La DMD se produce como consecuencia de una ausencia total de distrofina. El principal síntoma que lleva a los padres de niños con DMD a la consulta es la alteración de la marcha, y suele ser entre los 2 y 5 años. Sin embargo, las CKs se encuentran elevadas desde el nacimiento, por lo que puede detectarse su elevación antes del inicio de los síntomas. En ausencia de esta determinación, la marcha de puntillas y la debilidad proximal que dificulta subir escaleras o incorporarse del suelo (para lo cual utilizan la maniobra de Gowers) son los primeros signos de alarma. En la exploración es típica la hipertrofia gemelar y las contracturas aquíleas. La cognición y el lenguaje también pueden verse afectados, y trastornos como el obsesivo-compulsivo, el autismo o el déficit de atención son más frecuentes que en la población general. Con el tiempo, estos niños también desarrollan escoliosis, y si no son tratados con corticoides, pierden la deambulación en torno a los 12 años. Posteriormente la pérdida de fuerza afecta a los brazos y a la musculatura respiratoria, lo que conduce a insuficiencia respiratoria que en estadios avanzados requiere soporte ventilatorio. Estos pacientes también desarrollan con la edad una miocardiopatía dilatada.

El tratamiento con glucocorticoides y el abordaje multidisciplinar ha mejorado sustancialmente su esperanza de vida⁷⁵.

1.3.1.1. Tratamiento de la DMD

Existen algunos tratamientos específicos para la DMD que han demostrado reducir la velocidad de progresión de la enfermedad.

1.3.1.1.1. Glucocorticoides

La efectividad del tratamiento con glucocorticoides en la DMD se demostró por primera vez en 1974 en un grupo de 14 pacientes⁷⁶. Desde entonces, el tratamiento precoz se ha relacionado con un retraso en la pérdida de la marcha, mejora de la fuerza en extremidades superiores, disminución del riesgo de escoliosis y beneficios a nivel cardiorrespiratorio^{77,78}.

1.3.1.1.2. Otras terapias

En el momento actual hay varias terapias en estudio para el tratamiento de la DMD. Se centran en dos estrategias fundamentalmente: la primera consiste en aumentar la expresión de distrofina y la segunda en reducir el proceso fisiopatológico resultante de la mutación⁷⁹.

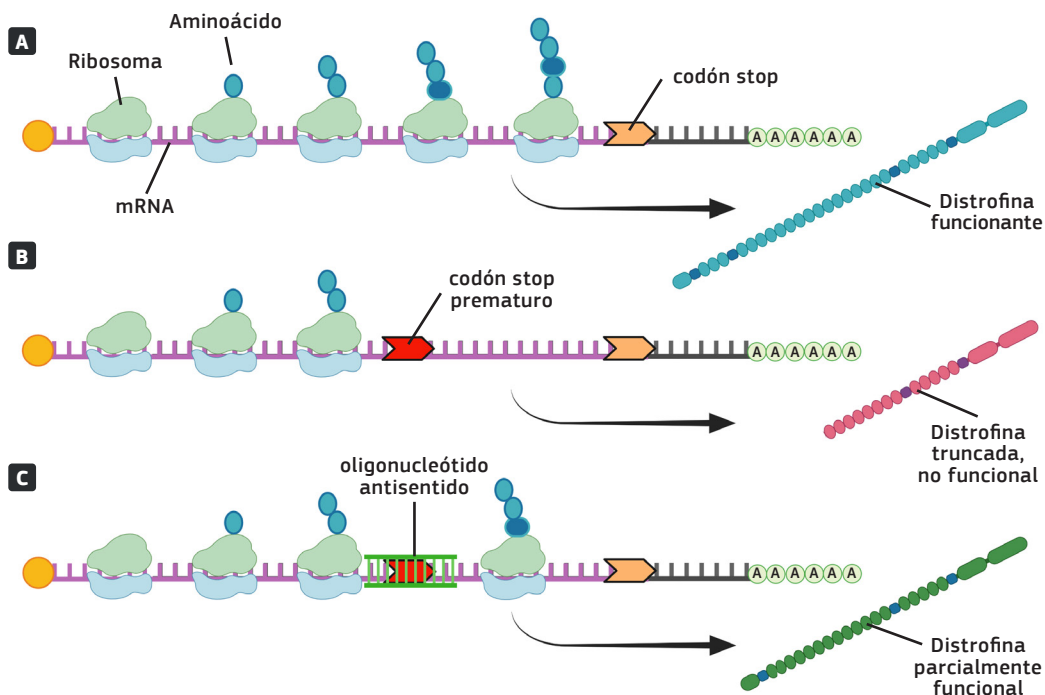


Figura 3.1: Esquema de funcionamiento de los oligonucleótidos antisentido.

A: Traducción normal de la molécula de distrofina. **B:** Traducción defectuosa de la distrofina debido a la presencia de un codón de terminación prematuro (codón stop). **C:** Traducción facilitada por el oligonucleótido antisentido, con la obtención de una proteína parcialmente funcional. *Imagen creada con Biorender*

1.3.1.1.2.1. Terapias dirigidas a aumentar la expresión de distrofina

1.3.1.1.2.1.1. Oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido son moléculas diseñadas para unirse a una región específica del RNA mensajero (RNAm) y modificar así su traducción a proteína. Los genotipos causados por mutaciones puntuales que producen un codón de terminación precoz son susceptibles de ser tratados mediante estas terapias. El oligonucleótido antisentido se une al RNAm produciendo un “salto” en la lectura, y evitando así el truncamiento precoz de la proteína (**Figura 3.1**). Se produce, por tanto, una distrofina incompleta pero funcional, lo que teóricamente se traduciría en un cambio del fenotipo DMD a un fenotipo BMD.

Hasta el momento existen 5 terapias aprobadas para tratamiento en humanos con DMD basados en este mecanismo de acción. Sin embargo, tres de ellos están todavía en fase de ensayo clínico (casimersen para el salto del exón 45 y viltolarsen y golodirsen para el exón 53), y los dos que hay aprobados no están exentos de polémica (ataluren y eteplirsen). El primero consiguió la aprobación de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés), pero fue rechazada por la Administración de Alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA), mientras que con el segundo sucedió exactamente al revés: fue aprobado por la FDA pero no por la EMA^{80,81}. La razón de estas discrepancias tiene su origen en la dificultad para establecer, en base a los ensayos clínicos, si el tratamiento es efectivo o no. A pesar del hecho de que la DMD es una enfermedad lentamente progresiva, los ensayos clínicos no pueden ser muy largos para ser económicamente viables. Por ello, es fundamental disponer de medidas de resultados que sean capaces de reflejar la progresión de la enfermedad en periodos cortos de tiempo. En los ensayos clínicos de ataluren y eteplirsen se utilizó como medida primaria de resultados el test de la marcha de los 6 minutos (*6-minute walk test* o 6MWT), que si bien es un test aprobado y validado para la DMD⁸², también ha recibido críticas por verse influenciado por otros parámetros independientes de la distrofia, como la motivación del niño, o el nivel de cansancio del día de la prueba. Además, el 6MWT no es aplicable a pacientes no ambulantes.

1.3.1.1.2.1.2. Terapia génica

La terapia génica pretende administrar una copia funcional del gen *DMD* a pacientes con mutaciones del mismo, para que pueda ser transcrito a una proteína funcional. Todavía quedan muchos problemas sin resolver en este sentido: por un lado, en gen *DMD* es demasiado grande para introducirlo en un virus adeno-asociado (AAV, por sus siglas en inglés), que es el vector viral más utilizado en los ensayos clínicos. Por otro lado, conseguir que el tratamiento alcance todas las fibras musculares del organismo y evitar la respuesta inmune ante el AAV siguen siendo retos para el desarrollo de este tipo de terapias⁷⁹.

En el momento actual no existe ningún tratamiento aprobado para pacientes con DMD basado en terapia génica.

1.3.1.1.2.2. Terapias dirigidas a la supresión del proceso fibrótico

El mecanismo de degeneración y regeneración muscular es complejo, y en él están involucradas diversas células (células fibro-adipogénicas, satélites, macrófagos...), citoquinas (factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1), interleucina 6 (IL-6)...) y otras moléculas. Los procesos epigenéticos como la acetilación de las histonas también parecen jugar un rol importante en la regeneración muscular⁸³. En las distrofias musculares este proceso se encuentra alterado, lo que conduce a proliferación de tejido fibro-adiposo, en lugar de a una regeneración efectiva del músculo. Terapias que consigan interferir en este proceso, frenando la evolución de la degeneración muscular serían de gran interés ya que podrían utilizarse en todos los pacientes independientemente del tipo de mutación subyacente. Givinostat es un inhibidor de la histona-deacetilasa que se encuentra en fase de ensayo clínico en pacientes con DMD.

1.3.2. Distrofia muscular de Becker (BMD)

En la BMD la mutación de *DMD* produce una proteína defectuosa pero parcialmente funcional, por lo que en la biopsia muscular se puede apreciar una cantidad variable de distrofina (**Figura 3.2**)⁸⁴.

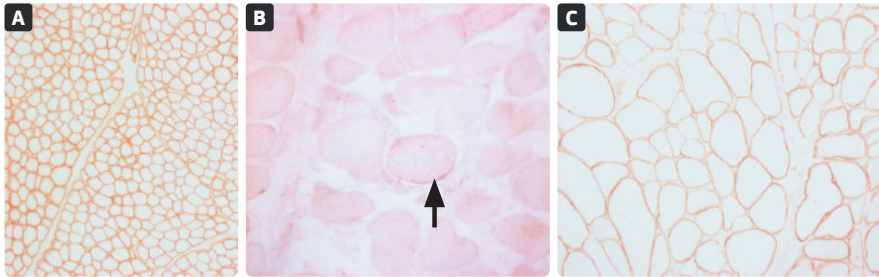


Figura 3.2: Inmunohistoquímica para distrofina.

- A:** Músculo normal, donde se aprecia la tinción normal en la membrana de todas las fibras musculares.
B: Distrofia Muscular de Duchenne. Con excepción de una leve captación en una fibra aislada (*flecha*), las demás células no muestran captación de la tinción. **C:** Distrofia Muscular de Becker. Se observa irregularidad tanto del tamaño de las fibras como de la inmunohistoquímica para distrofina.
*Imagen adaptada de Dubowitz et al.*⁸

Aunque el fenotipo suele ser más leve que en la DMD, la edad de presentación y la gravedad de la enfermedad puede llegar a ser muy variable. En función del tipo de mutación, el espectro clínico se extiende desde la pérdida de la marcha en la segunda década hasta la hiperCKemia paucisintomática. En contraste con la DMD, la evolución de la enfermedad es más lenta y es característico el desarrollo de una miocardiopatía dilatada cuya gravedad no es proporcional a la debilidad del músculo esquelético. En algunos casos puede incluso aparecer la cardiopatía en ausencia de debilidad muscular, lo que se ha denominado “cardiopatía ligada al cromosoma X”, y se considera un fenotipo aparte dentro del grupo de distrofinopatías⁸⁵.

El tratamiento de la BMD está limitado al alivio sintomático y prevención de complicaciones, ya que el beneficio de los corticoides no está demostrado, por lo que su uso es controvertido.

1.3.3. Mujeres portadoras

Las mujeres portadoras de mutaciones en el gen de la distrofina son en su mayoría asintomáticas. Sin embargo, según un estudio realizado en 129 portadoras, un 22% tenían algún síntoma, un 17% manifestaban debilidad en la exploración física y hasta un 36% mostraron alguna anomalía en la ecocardiografía o el electrocardiograma. Estas alteraciones cardíacas eran similares a las encontradas en pacientes con DMD o BMD, sin embargo solo un 8%

mostraron cardiomiopatía dilatada ^{86,87}. Por ello, es recomendable realizar un examen cardiaco de forma periódica en estas pacientes.

1.3.4. Evaluación de la progresión de la enfermedad

Desde los años 80 se han venido desarrollando escalas y pruebas de función motora con el objetivo de monitorizar la progresión de la enfermedad en pacientes con DMD. Una de las primeras escalas validadas en esta enfermedad es el *North Star Ambulatory Assessment* (NSAA) ⁸⁸⁻⁹⁰. Se trata de un cuestionario con 17 ítems relacionados con funciones motoras de la vida diaria: mantenerse en pie, caminar, sostenerse sobre una pierna, levantarse de una silla, subir y bajar un escalón, levantarse del suelo, sentarse, elevar los brazos, caminar de talones, saltar y correr. También se han utilizado test funcionales medidos en tiempo, como el *run/walk 10m test* (10MWT), el *time to rise from the floor test* (TRF), el *time to climb 4 stairs* (Tup4) o *time to descend 4 stairs* (Tdo4). El test más utilizado, tanto en estudios de historia natural como en ensayos clínicos, es el test de la marcha de los 6 minutos o *6-minute walk test* (6MWT), que consiste en medir la distancia que el paciente puede caminar a la mayor velocidad posible durante 6 minutos ^{82,91,92}. Para superar la limitación que supone que la mayoría de estas pruebas solo son aplicables a pacientes ambulantes, en los últimos años se han comenzado a utilizar escalas que evalúan la funcionalidad de los miembros superiores, como el *performance of the upper limb* (PUL) y el *Brooke upper extremity functional rating* (escala de Brooke) ^{93,94}.

Con el incremento del conocimiento sobre el proceso fisiopatológico de la DMD y el desarrollo de potenciales terapias, se ha disparado el interés por la identificación de biomarcadores capaces de detectar cambios en periodos cortos de tiempo. En los últimos años, la investigación en este campo se centra en la RM muscular y los biomarcadores séricos, como las citoquinas, factores de crecimiento y los microRNAs, que están involucrados en el proceso de degeneración y regeneración muscular ^{95,96}. Muchas de estas proteínas son capaces de discernir entre pacientes y controles, y algunas han demostrado variar su concentración en estudios prospectivos. En general, las proteínas involucradas en la función muscular

disminuyen con el tiempo, mientras que las implicadas en la formación grasa o la respuesta al estrés oxidativo aumentan conforme progresa la enfermedad.

1.3.5. Técnicas de RM aplicadas a las distrofinopatías

Desde que se corroboró en la década de los 90 que la cantidad de grasa contenida en el músculo se relacionaba con las pruebas funcionales en los pacientes con DMD y que dicha cantidad puede estimarse mediante RM, el interés por esta técnica como herramienta de diagnóstico y seguimiento no ha parado de crecer^{97,98}.

Para el estudio de la estructura muscular pueden utilizarse, como ya hemos visto, secuencias potenciadas en T1 para diferenciar grasa y en T2 para identificar edema. Sin embargo, en la última década, las técnicas cuantitativas han aumentado progresivamente su popularidad. Las más utilizadas son el Dixon, el T2-*mapping* y la espectroscopia⁹⁸.

Los estudios transversales coinciden en la presencia de un patrón de infiltración grasa muscular distintivo de las distrofinopatías. Este patrón es, además, similar en la DMD y la BMD, a pesar de que el grado de infiltración en pacientes con BMD es muy variable (**Figura 3.3**). Los músculos más afectados son: a nivel pélvico, los glúteos *maximus* y *medius*; en los muslos, el *adductor magnus* y la cabeza larga del *biceps femoris*, con una afectación también precoz del *quadriceps femoris*; y a nivel infrapatelar el *soleus* y el *gastrocnemius medialis*. En el extremo opuesto, algunos músculos no se infiltran hasta estadios avanzados de la enfermedad, como es el caso del *tibialis posterior*, el *sartorius*, el *gracilis* y los obturadores^{34,35,97,99}. También es posible estimar el tamaño muscular midiendo el área en la sección axial del músculo. Los pacientes con DMD tienen un área mayor del compartimento posterior de la pierna en comparación con controles, lo cual se corresponde con la presencia clínica de la pseudohipertrofia gemelar. El área del cuádriceps también es mayor en pacientes con DMD, sin embargo esta relación se invierte a partir de los 11 años, pasando a ser los controles los que tienen mayor área¹⁰⁰.

1 INTRODUCCIÓN

En la DMD, la mayoría de estudios muestran correlaciones entre la situación funcional, medida con pruebas físicas o escalas, y el grado de infiltración grasa^{35,49,104-107,51,52,64,93,97,101-103}. Un estudio encontró también diferencias en la señal T2 y en la fracción grasa entre pacientes tratados con corticoides y pacientes sin tratamiento¹⁰⁵.

En la BMD también se ha demostrado la correlación entre RM y pruebas físicas^{34,48,50,108}, así como entre el tipo de mutación y el grado de infiltración grasa¹⁰⁸. Esto nos permite inferir, a partir de una mutación determinada, si el paciente sufrirá una evolución más o menos agresiva.

En los últimos 10 años también ha aumentado el número de estudios longitudinales, que muestran un incremento del contenido graso del músculo que en ocasiones no es objetivado por las pruebas físicas^{48,49,109,50-52,60,105-108}. Esto indica que la RM permite identificar cambios en la estructura muscular (y, por tanto, progresión de la enfermedad) antes de que estos sean evidentes en las escalas o las pruebas físicas. La fracción grasa medida mediante técnicas Dixon puede incluso predecir la edad de la pérdida de la deambulación, tal como sugiere un estudio de Holanda¹¹⁰.

Los músculos más estudiados en las distrofinopatías (como en el resto de enfermedades musculares) son los de las piernas, principalmente por ser más accesibles para el estudio con RM. Sin embargo, algunos estudios recientes se han enfocado en otros grupos musculares, como los miembros superiores^{51,60,111-114} o el diafragma¹¹⁵.

A pesar de que, por un lado, se considera que la RM es una buena herramienta para seguir la evolución de la enfermedad y, por otro, se están estudiando múltiples proteínas solubles y factores de crecimiento como posibles biomarcadores, a nuestro saber no hay estudios que intenten correlacionar ambas herramientas.

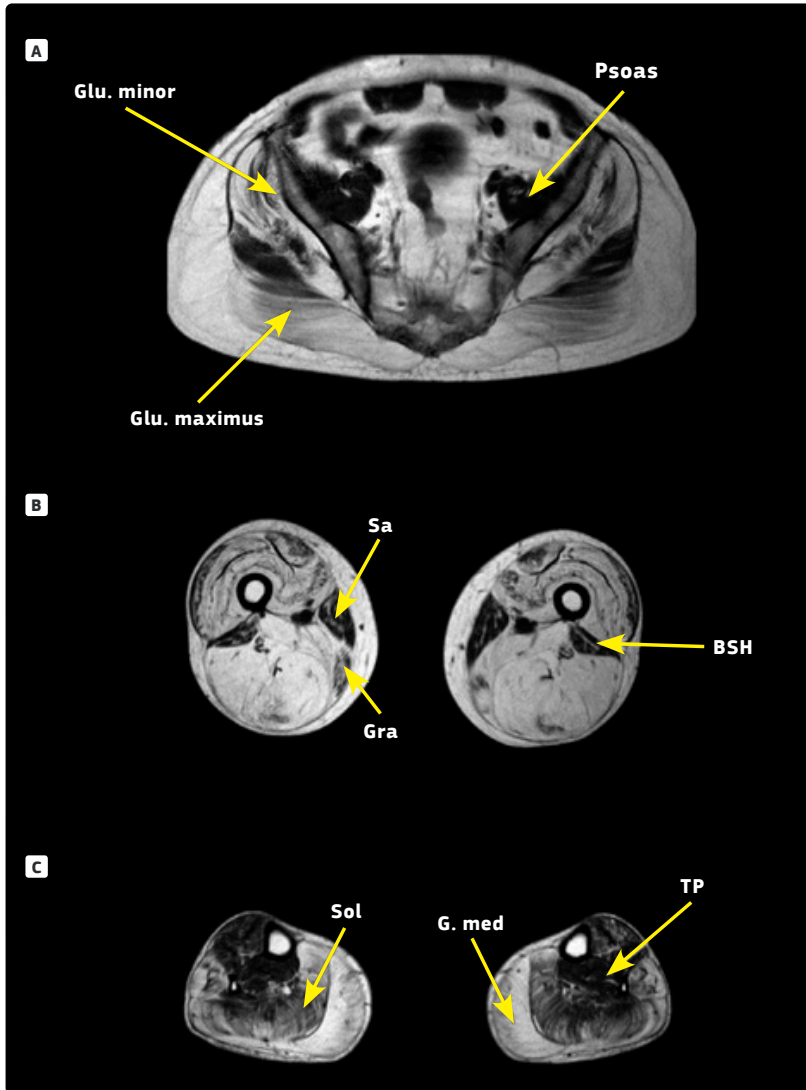


Figura 3.3: RM muscular de un paciente con BMD.

A: sección axial a nivel pélvico. Se observa marcada infiltración grasa a nivel glúteo con preservación del músculo psoas. **B:** Sección a nivel del muslo. La infiltración grasa predomina tanto en el compartimento anterior como el posterior, pero los músculos sartorio, gracilis y la cabeza corta del bíceps se encuentran respetados. **C:** Sección a nivel de la pantorrilla. Se observa infiltración del compartimento posterior y de los músculos peroneos, con preservación del músculo tibial posterior. **Glu. Minor:** gluteus minor. **Glu. Maximus:** gluteus maximus. **Sa:** Sartorius. **Gra:** Gracilis. **BSH:** bíceps short head. **Sol:** Soleus. **G. med:** gastrocnemius medialis. **TP:** tibialis posterior. *Imagen adaptada de Díaz-Manera 2015⁴⁹*

1.4. DISTROFIA OCULOFARÍNGEA

El primer artículo de la presente tesis está centrado en la descripción del patrón de infiltración grasa muscular en RM de la distrofia oculofaríngea (DOF).

La DOF es una distrofia muscular de inicio tardío, caracterizada principalmente por el desarrollo lentamente progresivo de ptosis y disfagia. Se trata de una enfermedad producida como consecuencia de la repetición anómala de tripletes en el gen *polyadenylate-binding protein nuclear 1 (PABPN1)* y transmitida de forma autosómica dominante. A pesar de ser una enfermedad infrecuente, en determinadas áreas geográficas la prevalencia está incrementada, como es el caso de Quebec (Canadá), Israel, Uruguay y las Islas Canarias (España) ¹¹⁶⁻¹¹⁹. Estas áreas de elevada prevalencia se originan como consecuencia de mutaciones fundadoras y fenómenos migratorios.

La enfermedad suele iniciarse en la cuarta o quinta década de la vida. Los síntomas de inicio más reportados son ptosis palpebral bilateral y disfagia para sólidos. Ambos se presentan de forma insidiosa, por lo que pueden pasar desapercibidos los primeros años.



Figura 4.1: Fotografías de dos pacientes con distrofia oculofaríngea. Obsérvese la ptosis bilateral y la contracción del músculo frontal con el objetivo de mantener la apertura ocular

Para intentar compensar la pérdida de fuerza del músculo elevador del párpado, los pacientes elevan las cejas contrayendo la musculatura frontal y, cuando la ptosis es grave, extendiendo

el cuello para mantener una apertura palpebral que les permita la visión (**Figura 4.1**). En ocasiones se puede afectar la musculatura extraocular produciendo oftalmoparesia, pero la diplopía es infrecuente ¹²⁰.

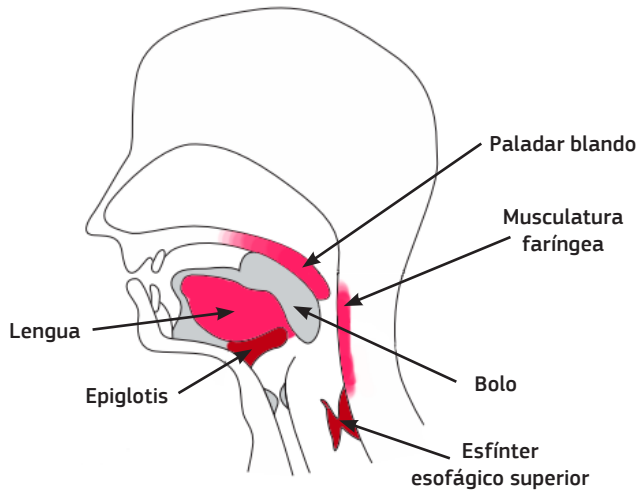


Figura 4.2: Representación esquemática de la fase faríngea de la deglución. Las estructuras coloreadas se encuentran afectadas en la DOF, dificultando la progresión del bolo alimenticio. *Adaptada de Souto Camba et al.* ¹²⁵

En cuanto a la disfagia, los pacientes suelen referir la sensación de que la comida se queda estancada en la garganta (fundamentalmente sólidos). Esta es una característica distintiva respecto a otras enfermedades neuromusculares en las que la alteración para la deglución se produce principalmente con líquidos. La disfagia puede clasificarse de forma general en alteraciones de la eficiencia de la deglución (que conducen a una pérdida de peso y malnutrición) y de la seguridad (que ocasiona neumonías aspirativas). En la DOF confluyen ambos problemas (**Figura 4.2**). Por un lado, los pacientes tienen debilidad y atrofia lingual, lo que dificulta la formación del bolo alimenticio. Por otro lado, se produce una debilidad de la musculatura faríngea, con la consiguiente disminución de la presión faríngea e hipertonía del esfínter esofágico superior, lo que dificulta el paso del bolo alimenticio al esófago ^{121,122}. Además, los problemas de la deglución incrementan el tiempo medio que estos pacientes necesitan para comer, lo que puede llevarlos a evitar situaciones en las que tengan que comer en público (reuniones familiares, laborales...) con el consecuente impacto psicosocial. Otros síntomas frecuentes son la alteración

1 INTRODUCCIÓN

de la articulación del habla en forma de disartria o nasalización de la voz, y en estadios más avanzados de la enfermedad, la debilidad proximal de miembros inferiores.

De forma más esporádica se puede observar debilidad en miembros superiores o cervical¹²³. Aunque no se ha descrito en la literatura, en la experiencia de la autora de esta tesis también puede encontrarse excepcionalmente escápula alada (**Figura 4.3**).



Figura 4.3: Paciente con DOF.
Observese la escápula alada bilateral asimétrica.

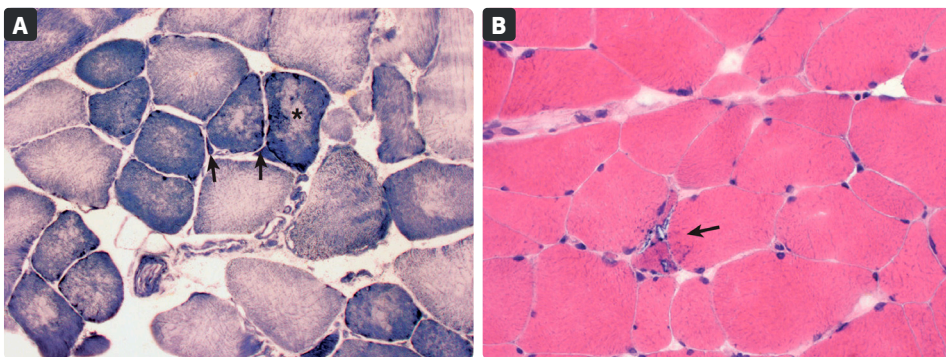


Figura 4.4: Biopsia de cuádriceps de un paciente con DOF. Microscopía óptica.

A: Tinción NADH-TR. Se pueden observar fibras de tamaño variable, con fibras pálidas hipertróficas, algunas fibras angulares pequeñas (*flechas*) y áreas “core-like” con ausencia de tinción (*). **B:** Tinción H&E. Se observa variabilidad del tamaño de las fibras, una de las cuales contiene vacuolas ribeteadas (*flecha*).

Imágenes adaptadas de Dubowitz et al.¹²⁷.

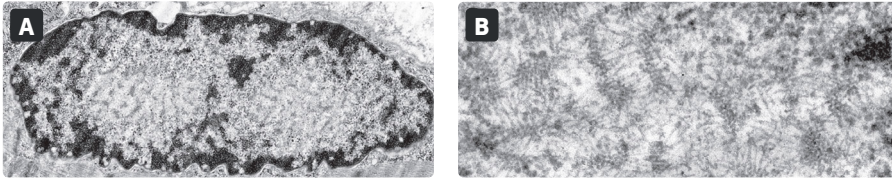


Figura 4.5: Microscopía electrónica del mismo paciente que la *figura 4.4*. **A.** Se observan las inclusiones intranucleares características de la DOF. **B.** Con mayor aumento se observan agregados en empalizada de filamentos de 8.5nm de diámetro.

Imágenes adaptadas de Dubowitz et al.¹²⁷

Desde el punto de vista anatomopatológico, la enfermedad se caracteriza por la presencia de inclusiones tubulofilamentosas intranucleares, visibles mediante microscopía electrónica en el músculo esquelético. Estas inclusiones se corresponden con la proteína PABPN1 mutada y mal plegada. Con microscopía óptica pueden apreciarse cambios miopáticos inespecíficos y alteraciones derivadas de la acumulación mitocondrial, como fibras lobuladas, fibras rojo-rasgadas o COX-negativas. También suelen observarse vacuolas ribeteadas, que, aunque son características de esta enfermedad, no son patognomónicas y pueden observarse en otras enfermedades (*Figuras 4.4 y 4.5*).



Figura 4.6: Representación gráfica de la secuencia de nucleótidos en el gen PABPN1 y su aminoácido correspondiente. Resaltados en rojo se indican los tripletes que se pueden encontrar expandidos en la DOF. **Met:** Metionina. **Ala:** Alanina.

La DOF se produce como consecuencia de una expansión corta de tripletes en el gen *PABPN1*, pero a diferencia de otras enfermedades producidas por repetición de tripletes, en la DOF no existe anticipación genética ni es necesaria un gran número de repeticiones para producir la enfermedad. Mientras que el alelo sano contiene 10 repeticiones GCN (donde “N” = G/A), los alelos mutados contienen entre 11 y 17 repeticiones. Dichos tripletes codifican el aminoácido alanina, por lo que la consecuencia de la extensión es la presencia de una cadena de alaninas anormalmente larga en la proteína PABPN1 (*Figura 4.6*). De forma

1 INTRODUCCIÓN

excepcional, la DOF también puede producirse por mutaciones puntuales que ocasionen igualmente una elongación de la cadena de alaninas¹²⁴⁻¹²⁶.

Existe una correlación entre el genotipo y el fenotipo de la enfermedad, de forma que los pacientes portadores de un alelo con mayor número de repeticiones experimentan una edad de inicio de la enfermedad más temprana y desarrollan debilidad de cinturas con más frecuencia¹²⁷. Los pacientes homocigotos o con heterocigosis compuesta también presentan un fenotipo más grave en comparación con aquellos portadores de una sola mutación^{127,128}. A pesar de que clásicamente se consideraba que existía también una forma de enfermedad recesiva, estudios recientes sugieren que el alelo (GCN)11, considerado responsable de dicha variante, tiene en realidad una expresión dominante con baja penetrancia y con un fenotipo más leve de la enfermedad¹²⁷. Según un estudio reciente de nuestro grupo sobre la prevalencia de DOF en las islas Canarias (J. Alonso-Perez et al, *in press*), el genotipo no sería el único factor determinante para la gravedad de la enfermedad, sino que otros factores podrían también jugar un papel. Esta hipótesis se desprende del hecho de que, en la cohorte canaria, los pacientes con el genotipo (GCN)15 tienen un fenotipo menos grave que los pacientes con el mismo genotipo descritos en la cohorte europea que se expone en la presente tesis.

1.4.1. Tratamiento

Hasta la fecha no existe un tratamiento curativo de la DOF. Las medidas terapéuticas están, por tanto, encaminadas al alivio sintomático. Hay tratamientos específicos para corregir la ptosis y la disfagia.

Cuando la ptosis es grave, afectando al campo visual, puede corregirse quirúrgicamente. La blefaroplastia no es la técnica más adecuada para la corrección de la ptosis en la DOF, a diferencia de para otras causas de ptosis, puesto que suele recidivar. La suspensión primaria del músculo frontal es una opción más duradera^{129,130}.

Para el tratamiento de la disfagia hay diversas opciones. En las fases iniciales se recomienda fisioterapia orofacial y reeducación de la deglución. Cuando la disfagia es más grave, afectando la seguridad, o cuando se produce pérdida de peso, la intervención más frecuentemente realizada es la miotomía del músculo cricofaríngeo, que alivia la presión del esfínter esofágico superior facilitando el paso del bolo alimenticio. Existen otras alternativas como la dilatación del esfínter esofágico por vía gastroscópica o la inyección de toxina botulínica en el músculo cricofaríngeo. La opción de una u otra técnica dependerá de la gravedad de la disfagia, las comorbilidades del paciente y la experiencia del centro de tratamiento¹³¹⁻¹³⁶. A pesar de la intervención, en muchos casos la disfagia sigue progresando y es necesario recurrir a la implantación de sondas de alimentación percutáneas (PEG).

En 2013 se publicaron los resultados de un ensayo clínico en fase I/IIa en el que la intervención consistía en la inyección de mioblastos autólogos (obtenidos de músculos presumiblemente no afectados por la enfermedad) junto a la realización de la miotomía cricofaríngea en 12 pacientes con DOF¹³⁷. A pesar de que los resultados fueron positivos, con una mejoría de la disfagia que se mantuvo hasta dos años después de la intervención, el estudio en fase III no ha llegado a llevarse a cabo.

Otros tratamientos como la terapia génica se encuentran en fase de investigación preclínica^{138,139}.

1.4.2. Técnicas de RM en la DOF

Antes de la publicación de nuestro artículo, los estudios de técnicas de imagen en DOF eran escasos y se limitaban a pequeñas series de pacientes. Los primeros casos en los que se hace mención a la infiltración grasa muscular objetivada mediante TC o RM describen afectación de la musculatura paravertebral, psoas y glúteos¹⁴⁰⁻¹⁴². Desde que comenzaron a hacerse estudios de la región faríngea llamó la atención de los autores la infiltración grasa lingual, incluso precediendo a la aparición de disfagia^{143,144}. A. Fischmann *et al.* ampliaron la descripción de músculos afectados tras estudiar mediante RM un grupo de 8 pacientes. En esta serie, los músculos más afectados a nivel del muslo fueron el *adductor magnus*, el

semimembranosus y el *biceps femoris*, y a nivel de la pierna, el *soleus*¹⁴⁵. En su estudio encontraron correlación entre el grado de infiltración grasa (estimado mediante una escala visual semicuantitativa) y la escala de función motora o *motor function measurement scale* (MFM). Dicha herramienta es utilizada para evaluar la función motora en tres dimensiones: posición erguida y transferencias, función motora proximal y función motora distal. Sin embargo, el reducido número de pacientes limitaba la obtención de conclusiones. El mismo grupo describió posteriormente la utilidad de las técnicas de RM cuantitativa para el estudio muscular de estos pacientes^{61,146}. Observaron que, tras 13 meses de seguimiento, la MFM no se modificaba con respecto a la exploración de la visita inicial, como tampoco lo hacía la infiltración grasa estimada mediante la escala visual semicuantitativa. No obstante, las medidas cuantitativas (Dixon y T2) sí que mostraron un incremento significativo de la fracción de grasa, lo que sugiere que la RM es capaz de detectar progresión de la enfermedad incluso antes de que sea clínicamente significativo. En 2017 Van der Sluijs *et al.* confirmaron nuevamente mediante RM cuantitativa el incremento de grasa en los músculos aductores y flexores de la rodilla en un grupo de 14 pacientes respecto a controles sanos¹⁴⁷. Todos estos estudios sugerían que los pacientes con DOF podrían tener un patrón de infiltración grasa característico; sin embargo, se trataba de series pequeñas de pacientes con sesgo geográfico. No existía ninguna descripción de cohortes grandes de pacientes, provenientes de diferentes países y con distintos genotipos que permitiera extraer conclusiones fidedignas.

1.5. ENFERMEDAD DE POMPE

El déficit de maltasa ácida o glucogenosis tipo II se conoce también como enfermedad de Pompe, en alusión al patólogo holandés que describió los hallazgos anatomopatológicos por primera vez¹⁴⁸.

Se trata de una enfermedad autosómica recesiva producida por mutaciones en el gen *GAA* que codifica la enzima lisosomal α -glucosilasa. Esta enzima tiene la función de degradar el glucógeno a glucosa dentro de los lisosomas. Cuando está ausente o tiene actividad disminuida, el glucógeno se acumula dentro de la célula en los tejidos afectados, que

mayoritariamente son el músculo esquelético y cardíaco¹⁴⁹. Esta acumulación, junto al malfuncionamiento del mecanismo de autofagia dentro de la célula, conduce a una pérdida de contractilidad de la fibra muscular¹⁵⁰.

En la biopsia muscular pueden observarse vacuolas dentro de las fibras musculares, las cuales se corresponden con los depósitos de glucógeno y, por tanto, se tiñen intensamente con la tinción de ácido Peryódico de Schiff (PAS). También se encuentra incrementada la actividad de la fosfatasa ácida, debido a la localización lisosomal de la α -glucosilasa (*Figura 5.1*).

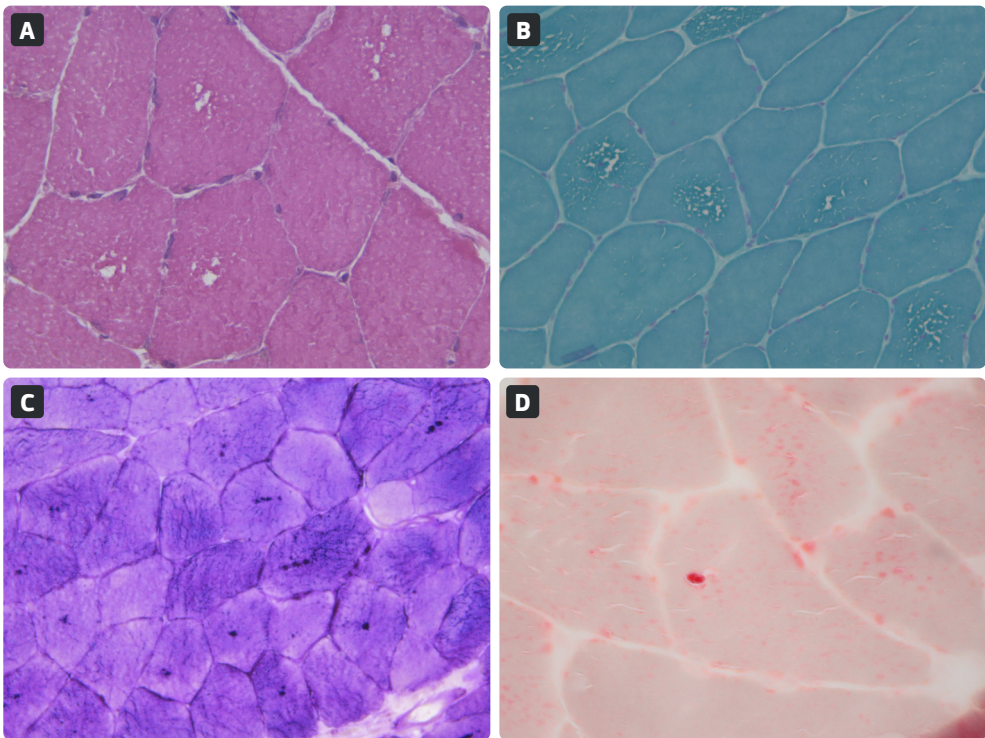


Figura 5.1: Biopsia muscular de un paciente con enfermedad de Pompe.

A: Tinción de hematoxilina-eosina donde se aprecian varias vacuolas en el interior de las fibras musculares. **B:** Tinción tricrómico de Gomori que también muestra vacuolas en las fibras. **C:** Tinción de PAS donde se observan vacuolas llenas de material PAS positivo. **D:** Actividad de la fosfatasa ácida aumentada en el interior de una de las vacuolas.

Dependiendo del tipo de mutación (se han descrito más de 500) la enzima α -glucosilasa ácida puede tener diferentes grados de actividad residual, en función de los cuales el

fenotipo será más o menos grave. Aunque se trata de un espectro continuo entre las formas graves de la infancia y las del adulto de inicio tardío, en general se reconocen tres grupos: enfermedad de Pompe infantil precoz, enfermedad de Pompe juvenil o infantil tardía y enfermedad de Pompe del adulto.

1.5.1. Enfermedad de Pompe infantil precoz

La enfermedad de Pompe de inicio precoz se debe a una actividad de la α -glucosilasa ácida menor del 1%; esto es, una ausencia prácticamente completa de la actividad enzimática. Los niños afectados presentan una miocardiopatía dilatada rápidamente progresiva, con hipotonía, debilidad muscular generalizada y elevación de CKs. Algunos hitos motores como la capacidad para rodar, sentarse o caminar no llegan a alcanzarse, y los pacientes desarrollan distrés respiratorio precoz. A pesar de esta presentación clínica homogénea, se pueden distinguir dos grupos de pacientes en función de si producen una pequeña cantidad de enzima no funcional (pacientes “CRIM positivos” donde CRIM = *cross-reactive immunological material*) o no producen enzima en absoluto (“CRIM negativos”). Esta diferenciación tiene consecuencias terapéuticas como se explicará más adelante. Sin tratamiento, los pacientes suelen fallecer por fracaso cardiorrespiratorio en el primer año de vida. Hay un grupo de pacientes con edad de inicio similar pero que no desarrollan una cardiopatía grave, cuya entidad suele considerarse como “enfermedad de Pompe infantil no clásica”. La terapia de reemplazo enzimático ha mejorado la supervivencia de estos pacientes, como se comentará más adelante¹⁵⁰.

1.5.2. Enfermedad de Pompe juvenil

La enfermedad de Pompe de inicio juvenil comienza en la infancia, pero la afectación predomina en el músculo esquelético y no se produce miocardiopatía dilatada como en la enfermedad de Pompe de inicio precoz. El fenotipo forma un continuo con la enfermedad de Pompe del adulto.

1.5.3. Enfermedad de Pompe del adulto o de inicio tardío

El tercer artículo de esta tesis incluye pacientes con este fenotipo. La enfermedad de Pompe de inicio tardío se inicia en la edad adulta y se manifiesta como una debilidad muscular

proximal de predominio en la cintura pélvica, con mayor afectación de los músculos glúteos y también implicación de la musculatura abdominal, lo que confiere a los pacientes un patrón de la marcha característico. No es típica la cardiomiopatía, pero sí la afectación respiratoria debido fundamentalmente a disfunción diafragmática. Existe una gran variabilidad entre pacientes, con un fenotipo que puede ir desde hiperCKemia asintomática hasta debilidad muscular y respiratoria grave.

Debido a su variabilidad en cuanto a la severidad y al claro efecto beneficioso del tratamiento, es importante considerar la posibilidad de enfermedad de Pompe en pacientes con debilidad de cinturas o con hiperCKemia asintomática. El cribado se realiza con la determinación de la actividad de la enzima α -glicosilasa, que puede realizarse de forma sencilla con el test de la gota seca. No obstante, el diagnóstico de certeza, sin embargo, precisa la confirmación de dos mutaciones en homocigosis o en heterocigosis compuesta en el gen *GAA* o la determinación de una actividad reducida de la α -glicosilasa en leucocitos, fibroblastos o músculo esquelético¹⁵¹. Debido a las crecientes evidencias de la mayor efectividad del tratamiento de sustitución enzimática cuando se inicia de forma precoz, muchos grupos de profesionales abogan por la implementación del screening neonatal. De momento está implantado en algunos países (Taiwán y Japón) y estados de Estados Unidos, y se han realizado diversos estudios piloto en otros países (Italia, Hungría y Austria)¹⁵²⁻¹⁵⁸.

1.5.4. Tratamiento en la enfermedad de Pompe

La terapia de reemplazo enzimático (ERT) con α -alglucosilasa (un tipo de α -glucosidasa ácida recombinante humana [rhGAA]) está disponible desde 2006. El tratamiento ha demostrado efectividad en ensayos clínicos tanto en niños como en adultos^{159,160}. Las formas infantiles de enfermedad de Pompe muestran una mejoría tanto en la supervivencia como en las capacidades motoras.

En el ensayo clínico en adultos también se observó un beneficio clínico evidente, tanto en la función pulmonar como en la distancia recorrida en el 6MWT. El tratamiento debe

administrarse de forma intravenosa cada dos semanas. En algunos países se han establecido opciones de tratamiento a domicilio, mejorando así la experiencia del paciente.

Es importante destacar que el subgrupo de pacientes CRIM negativo no responde adecuadamente a la terapia con remplazo enzimático y fallecen en los primeros años de vida a pesar del tratamiento precoz. Esto se debe a que, al carecer completamente de producción enzimática, su organismo reconoce la rhGAA como extraña y la neutraliza mediante producción de anticuerpos.

Recientemente se han reportado los resultados de un ensayo clínico en pacientes adultos con la molécula α -avalglucosidasa (Neo-GAA), que es una α -glucosidasa ácida modificada que contiene mayor cantidad de manosa-6-fosfato con el objetivo de incrementar la internalización de la enzima por parte del músculo esquelético. Según el ensayo clínico, los pacientes que recibieron Neo-GAA mostraron mejores resultados en las pruebas respiratorias y en el 6MWT que los pacientes tratados con rhGAA, resultando estadísticamente “no inferior”¹⁶¹. Su uso en pacientes con enfermedad de Pompe ha sido aprobado en julio por la EMA y en agosto por la FDA¹⁶².

1.5.5. Técnicas de RM en la enfermedad de Pompe del adulto

La enfermedad de Pompe es una de las pocas miopatías de origen genético para la cual existe un tratamiento capaz de modificar la historia natural de la enfermedad. Por ello, su estudio mediante RM siempre ha despertado un gran interés. Ser capaz de detectar cambios en el tejido muscular y de monitorizar la respuesta al tratamiento mediante técnicas de imagen es algo muy prometedor, que podría extrapolarse a otras miopatías genéticas para las cuales se desarrollen nuevos tratamientos. Por otro lado, ser capaces de visualizar los fenómenos fisiopatológicos de esta enfermedad, como la acumulación de glucógeno en las fibras es un objetivo muy ambicioso.

La enfermedad de Pompe tiene un patrón de infiltración grasa muscular muy característico, lo cual es útil para el diagnóstico de la enfermedad. Los músculos que más precoz e intensamente se ven substituidos por grasa son: la lengua, el *subscapularis*, el *latissimus dorsi*,

la musculatura paraespinal y abdominal, el *psaos*, los glúteos, el *adductor magnus*, *semi-membranosus* y *vastus intermedius*^{26,163,164}. En el extremo opuesto, el *rectus femoris*, el *sartorius*, el *gracilis*, la musculatura de los brazos y distal de las piernas se encuentra respetada hasta estadios muy avanzados de la enfermedad (**Figura 5.2**). Incluso en pacientes presintomáticos pueden apreciarse cambios en las secuencias potenciadas en T1: la lengua, la musculatura paraespinal y abdominal y el *adductor magnus* pueden presentar cierto grado de sustitución grasa precediendo el inicio de los síntomas^{165,166}.

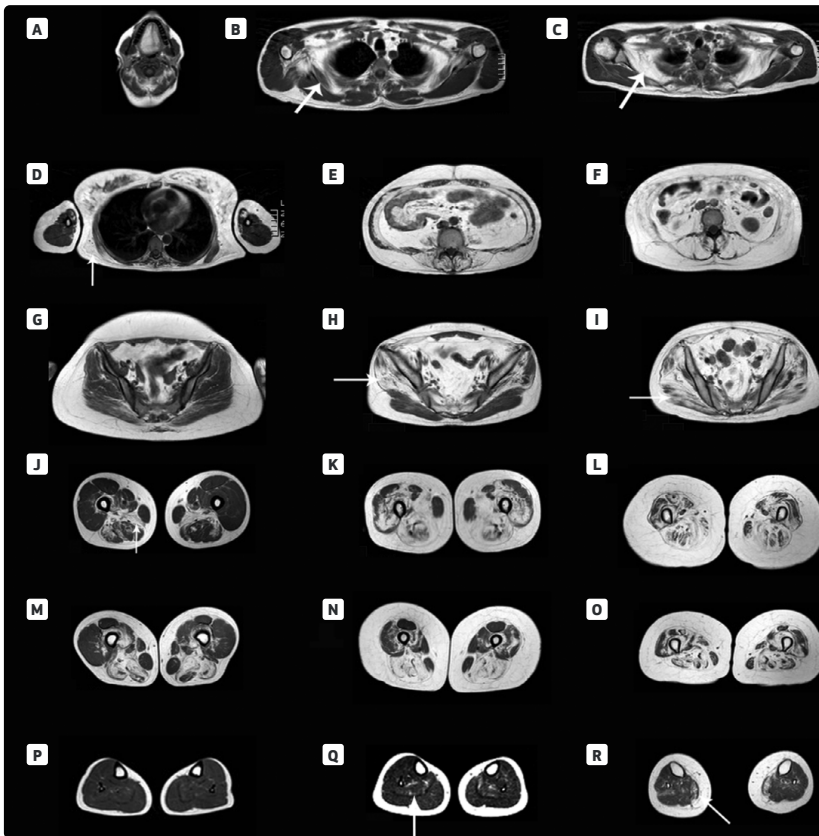


Figura 5.2: RM de 7 pacientes con enfermedad de Pompe del adulto.

A: Infiltración grasa en la lengua. **B y C:** infiltración del músculo subescapular (*flecha*) en la cintura escapular. **D:** Afectación del latissimus dorsi (*flecha*) con preservación de la musculatura braquial. **E y F:** Afectación de la musculatura abdominal y paraespinal. **G-I:** afectación de la musculatura glútea en diferentes grados de la enfermedad. **J-L:** Afectación a nivel del muslo, donde se aprecia la afectación precoz de los músculos aductores, y del resto del compartimento posterior en etapas más avanzadas. **M-O:** En el compartimento anterior suele existir un gradiente de afectación del cuádriceps próximo-distal. **P-R:** La región infrapatelar está preservada incluso en estadios avanzados de la enfermedad.

Las imágenes son secuencias potenciadas en T1. *Adaptada de Diaz-Manera et al.*²⁵

1 INTRODUCCIÓN

Este patrón de infiltración es distinto respecto al de otras enfermedades musculares. Las distrofias musculares más parecidas, desde el punto de vista de la RM, son las sarcoglicanopatías, las cuales comparten un patrón de infiltración grasa similar, caracterizado por la afectación de la musculatura abdominal, paravertebral y glútea con preservación de la musculatura distal de las piernas³¹. Sin embargo, se distingue de la enfermedad de Pompe en que estos pacientes no suelen tener implicación de la lengua.

Las técnicas utilizadas para resaltar el agua, como el STIR o el T2, pueden mostrar un aumento de la señal, especialmente en pacientes jóvenes o presintomáticos^{167,168}. Este incremento de la señal podría preceder a la infiltración grasa, según PG Carlier *et al*⁵³. En su estudio prospectivo de 24 pacientes encuentran una asociación entre la señal T2 en la visita basal y la infiltración grasa medida con Dixon al año de seguimiento. Sin embargo, la causa de este aumento de señal T2 no está dilucidada. Podría ser un marcador de necrosis activa o un marcador del agua retenida por el glucógeno, pero la falta de estudios histopatológicos dificulta la obtención de conclusiones.

Hasta la fecha se han publicado números estudios de seguimiento de pacientes con enfermedad de Pompe^{58,166,169-173}. Estos estudios arrojan datos muy interesantes: en primer lugar, en concordancia con los estudios en otras enfermedades musculares, muestran que el contenido graso se correlaciona con la función física, medida mediante pruebas como el 6MWT y cuestionarios como el ACTIVLIM. Por lo tanto, corroboran el uso de la RM como herramienta de seguimiento. También destacan la superioridad de las técnicas cuantitativas de RM sobre las pruebas físicas, ya que las primeras muestran cambios en periodos cortos de tiempo en los que la función física se mantiene inalterada. Por otro lado, a parte de la FF, algunos artículos miden el área muscular en la sección axial, mostrando que en los primeros 6 meses tras iniciar el tratamiento con ERT se produce un aumento del volumen muscular (sobre todo en músculos sin infiltración grasa) seguido de una pérdida progresiva del mismo más allá de los 6 meses. Sería interesante conocer las diferencias entre pacientes tratados mediante ERT y no tratados; sin embargo, los datos al respecto son muy escasos debido a

la importancia de iniciar el tratamiento de forma precoz y las connotaciones éticas de no hacerlo. El estudio de Núñez-Peralta *et al.*⁵⁸ incluyó 4 pacientes que iniciaron el tratamiento tras la primera visita del estudio. Estos pacientes mostraron durante el primer año de seguimiento un incremento de la FF de 3.39% en comparación con los pacientes tratados, en los que fue de 1.9%. Sin embargo, ese dato debe interpretarse con cautela debido al reducido número de pacientes.

Un objetivo todavía por alcanzar en la enfermedad de Pompe es la cuantificación del glucógeno muscular por medio de la RM. Su detección sería de gran valor, pues nos permitiría estudiar los estadios más incipientes de la enfermedad, cuando todavía no hay infiltración grasa muscular. De esta forma, podríamos medir el efecto del tratamiento (tanto con ERT como con futuras terapias) de una forma no invasiva antes de que el músculo fuese sustituido por grasa, lo cual supone ya un cambio irreversible. En este sentido hay técnicas muy prometedoras en fase de investigación, como la espectroscopia del ^{13}C y del ^1H , las imágenes de transferencia de saturación de intercambio químico (GlycoCEST), o la aplicación del efecto overhauser nuclear a la detección de glucógeno (NOECEST). De momento estas técnicas se han utilizado mayormente en modelos animales y para detectar glucógeno hepático²⁰. Tan solo hay un estudio con espectroscopia del ^{13}C en pacientes con enfermedad de Pompe, pero sus resultados son interesantes, ya que encontraron un aumento del cociente glucógeno: creatina en un grupo de 11 pacientes con enfermedad de Pompe en contraste con los controles sanos¹⁷⁴.

2

HIPÓTESIS



- ▶ **Hipótesis 1:** los pacientes con DOF presentan un patrón de infiltración grasa muscular característico y específico de esta enfermedad que puede identificarse mediante RM.
- ▶ **Hipótesis 2:** El grado de infiltración grasa muscular de pacientes con DMD y BMD cuantificado mediante técnicas 2-punto Dixon correlaciona con pruebas funcionales y marcadores serológicos y por tanto, es útil para el seguimiento de estos pacientes
- ▶ **Hipótesis 3:** En el análisis cuantitativo de infiltración grasa muscular en imágenes 2-punto Dixon, las estrategias de análisis total del muslo, por compartimentos o por músculos individuales son equivalentes, por lo que puede ahorrarse tiempo de análisis si este se realiza de forma global.

3

OBJETIVOS



El objetivo principal de esta tesis es evaluar la utilidad de RM muscular como herramienta de diagnóstico y seguimiento en las miopatías hereditarias.

Los objetivos específicos son:

- ▶ **Objetivo 1:** El principal objetivo del estudio titulado *Muscle MRI in a large cohort of patients with Oculopharyngeal muscular dystrophy* es describir el patrón de infiltración grasa en una cohorte grande de pacientes con DOF, utilizando secuencias potenciadas en T1 de RM muscular de cuerpo entero. Como objetivos secundarios nos planteamos demostrar si existe correlación entre el grado de infiltración grasa y el genotipo, así como con la situación funcional de los pacientes.
- ▶ **Objetivo 2:** El principal objetivo del estudio titulado *Platelet derived growth factor-AA correlates with muscle function tests and quantitative muscle magnetic resonance in dystrophinopathies* es encontrar posibles correlaciones entre la infiltración grasa muscular determinada mediante técnicas de RM cuantitativa, factores de crecimiento séricos y pruebas de función muscular.
- ▶ **Objetivo 3:** El principal objetivo del estudio titulado *Different approaches to analyze muscle fat replacement with dixon MRI in Pompe disease* es establecer si diferentes formas de análisis de las imágenes obtenidas mediante secuencias 2-punto Dixon de RM cuantitativa son o no equivalentes y, por lo tanto, de indagar si estrategias de análisis que requieren menos tiempo por parte del clínico podrían utilizarse en la práctica clínica o en investigación.

4

COMPENDIO DE PUBLICACIONES



4.1. ARTÍCULO 1:

“Muscle MRI in a large cohort of patients with Oculopharyngeal muscular dystrophy”

Alicia Alonso-Jimenez, Rosemarie H M J M Kroon, Aida Alejaldre-Monforte, Claudia Nuñez-Peralta, Corinne G C Horlings, Baziel G M van Engelen, Montse Olivé, Laura González, Enric Verges-Gil, Carmen Paradas, Celedonio Márquez, Matteo Garibaldi, Pía Gallano, María José Rodríguez, Lidia Gonzalez-Quereda, Cristina Dominguez Gonzalez, John Vissing, Freja Fornander, Anne-Sofje Vibæk Eisum, Tania García-Sobrino, Julio Pardo, Roberto García-Figueiras, Nuria Muelas, Juan Jesús Vilchez, Solange Kapetanovic, Giorgio Tasca, Mauro Monforte, Enzo Ricci, María Teresa Gomez, Jorge Alfredo Bevilacqua, Jorge Diaz-Jara, Ivonne Ingrid Zamorano, Robert Yves Carlier, Pascal Laforet, Ana Pelayo-Negro, Alba Ramos-Fransi, Amaia Martínez, Chiara Marini-Bettolo, Volker Straub, Gerardo Gutiérrez, Tanya Stojkovic, María Asunción Martín, Germán Morís, Roberto Fernández-Torrón, Adolfo Lopez De Munain, Elena Cortes-Vicente, Luis Querol, Ricardo Rojas-García, Isabel Illa, Jordi Diaz-Manera

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2019 May;90(5):576-585. doi: 10.1136/jnnp-2018-319578. Epub 2018 Dec 8.

4.1.1. *Publicación original*

4.2. ARTÍCULO 2:

“Platelet derived growth factor-AA correlates with muscle function tests and quantitative muscle magnetic resonance in dystrophinopathies”

Alonso-Jiménez A, Fernández-Simón E, Natera-de Benito D, Ortez C, García C, Montiel E, Belmonte I, Pedrosa I, Segovia S, Piñol-Jurado P, Carrasco-Rozas A, Suárez-Calvet X, Jimenez-Mallebrera C, Nascimento A, Llauger J, Nuñez-Peralta C, Montesinos P, Alonso-Pérez J, Gallardo E, Illa I, Díaz-Manera J.

Front Neurol. 2021 Jun 11;12:659922. doi: 10.3389/fneur.2021.659922. eCollection 2021.

4.2.1. **Publicación original**

OPEN ACCESS

Edited by:

Jens Schmidt,
 Universitätsklinikum
 Göttingen, Germany

Reviewed by:

Melissa Hoijmans,
 VU University Medical
 Center, Netherlands
 John Vissing,
 Rigshospitalet, Denmark

***Correspondence:**

Jordi Díaz-Manera
 jordi.diaz-manera@newcastle.ac.uk

†These authors have contributed
 equally to this work and share first
 authorship

Specialty section:

This article was submitted to
 Neuromuscular Disorders and
 Peripheral Neuropathies,
 a section of the journal
 Frontiers in Neurology

Received: 02 February 2021

Accepted: 17 May 2021

Published: 11 June 2021

Citation:

Alonso-Jiménez A,
 Fernández-Simón E, Natera-de
 Benito D, Ortez C, García C,
 Montiel E, Belmonte I, Pedrosa I,
 Segovia S, Piñol-Jurado P,
 Carrasco-Rozas A, Suárez-Calvet X,
 Jiménez-Mallebrera C, Nascimento A,
 Llauger J, Nuñez-Peralta C,
 Montesinos P, Alonso-Pérez J,
 Gallardo E, Illa I and Díaz-Manera J
 (2021) Platelet Derived Growth
 Factor-AA Correlates With Muscle
 Function Tests and Quantitative
 Muscle Magnetic Resonance in
 Dystrophinopathies.
 Front. Neurol. 12:659922.
 doi: 10.3389/fneur.2021.659922

Platelet Derived Growth Factor-AA Correlates With Muscle Function Tests and Quantitative Muscle Magnetic Resonance in Dystrophinopathies

Alicia Alonso-Jiménez^{1,2†}, Esther Fernández-Simón^{1,3,4†}, Daniel Natera-de Benito⁵, Carlos Ortez⁵, Carme García⁶, Elena Montiel⁶, Izaskun Belmonte⁶, Irene Pedrosa⁶, Sonia Segovia^{1,3}, Patricia Piñol-Jurado^{1,3,4}, Ana Carrasco-Rozas^{1,3}, Xavier Suárez-Calvet^{1,3}, Cecilia Jiménez-Mallebrera^{3,5,7}, Andrés Nascimento^{3,5}, Jaume Llauger⁸, Claudia Nuñez-Peralta⁸, Paula Montesinos⁹, Jorge Alonso-Pérez^{1,3}, Eduard Gallardo^{1,3}, Isabel Illa^{1,3} and Jordi Díaz-Manera^{1,3,4*}

¹ Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ² Neurology Department, Neuromuscular Reference Center, University Hospital of Antwerp, Antwerp, Belgium, ³ Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain, ⁴ John Walton Muscular Dystrophy Research Centre, International Centre for Life, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom, ⁵ Neuromuscular Unit, Neuropediatrics Department, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, ⁶ Rehabilitation and Physiotherapy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁷ Departamento de Genética, Microbiología y Estadística, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁸ Radiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁹ Philips Healthcare Iberia, Madrid, Spain

Introduction: Duchenne (DMD) and Becker (BMD) muscular dystrophy are X-linked muscular disorders produced by mutations in the DMD gene which encodes the protein dystrophin. Both diseases are characterized by progressive involvement of skeletal, cardiac, and respiratory muscles. As new treatment strategies become available, reliable biomarkers and outcome measures that can monitor disease progression are needed for clinical trials.

Methods: We collected clinical and functional data and blood samples from 19 DMD patients, 13 BMD patients, and 66 healthy controls (8 pediatric and 58 adult controls), and blood samples from 15 patients with dysferlinopathy (DYSF) and studied the serum concentration of 4 growth factors involved in the process of muscle fibrosis. We correlated the serum concentration of these growth factors with several muscle function tests, spirometry results and fat fraction identified by quantitative Dixon muscle MRI.

Results: We found significant differences in the serum concentration of Platelet Derived Growth Factor-AA (PDGF-AA) between DMD patients and pediatric controls, in Connective Tissue Growth Factor (CTGF) between BMD patients and adult controls, and in and Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) between BMD and DYSF patients. PDGF-AA showed a good correlation with several muscle function tests for both DMD and BMD patients and with thigh fat fraction in BMD patients. Moreover, PDGF-AA levels

were increased in muscle biopsies of patients with DMD and BMD as was demonstrated by immunohistochemistry and Real-Time PCR studies.

Conclusion: Our study suggests that PDGF-AA should be further investigated in a larger cohort of DMD and BMD patients because it might be a good biomarker candidate to monitor the progression of these diseases.

Keywords: PDGF, MRI, biomarker, Duchenne, Becker, dystrophinopathy

INTRODUCTION

Duchenne (DMD) and Becker (BMD) muscular dystrophy are X-linked recessive disorders produced by mutations in the *DMD* gene which encodes the protein dystrophin (1). Dystrophin is a cytoplasmic protein which links the intracellular cytoskeleton network to transmembrane components of the dystrophin-glycoprotein complex, including dystroglycan, sarcoglycans, and sarcospan (2). Its role is to stabilize the membrane during muscle contraction to prevent contraction-induced damage (3).

DMD has an homogeneous clinical picture characterized by early onset of muscle weakness progressing during childhood and leading to loss of ambulation during adolescence (4). All DMD patients invariably develop cardiac and respiratory involvement, which are the main causes of death. In contrast, BMD is an heterogeneous disease characterized by muscle weakness of variable severity that can start during childhood but also late in adulthood (5). BMD patients can also develop respiratory and cardiac muscle involvement. Despite having substantial phenotypic differences, DMD and BMD share common pathological pathways. Mutations in the *DMD* gene lead to abnormal dystrophin expression which results in a fragile muscle membrane susceptible to be damaged during contraction (3, 6). Continuous muscle damage leads to persistent inflammation, muscle fiber necrosis and replacement by fat and fibrous tissue, producing permanent weakness and disability (6).

In slow progressive diseases, the identification of functional changes over a short period is not an easy task. In recent years several outcome measures such as the 6 Minutes-Walk Test (6MWT), the Timed Up-and-Go Test (TuGo) or the North Star Ambulatory Assessment (NSAA) have been developed to monitor muscle function in natural history studies and clinical trials (7–10). Additionally, specific tests have been developed to assess upper limb muscle function such as the Brooke Upper Extremity Functional Rating (Brooke scale) or the Performance of the Upper Limb (PUL) (11–13). However, as muscle fiber necrosis and replacement by fat is a slowly progressing process, changes in motor functional tests could take time to be evident. In view of this limitation, muscle magnetic resonance imaging (MRI) and serum biomarkers have been investigated as potential outcome measures that might complement muscle function tests (14–16). Although muscle MRI is becoming more widely accepted as a tool to monitor patients, there is not a serum biomarker accepted so far that correlates with several muscle function tests and that could therefore be considered useful for clinical trials or natural history studies.

The main aim of this study was to analyze the serum concentration of a group of growth factors related to the process of muscle fibrosis in a cohort of 19 patients with DMD and 13 patients with BMD and study whether there was a correlation with the results of muscle function tests and quantitative MRI (qMRI).

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Participants

We report the results of a transversal study of a cohort of 19 DMD and 13 BMD patients seen at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) and Hospital Sant Joan de Déu (HSJD) in Barcelona. All patients included in the study were assessed using muscle function tests and spirometry and filled out a daily life activities questionnaire. qMRI was not a mandatory test and was performed in a subset of patients followed-up in HSCSP only. Blood samples were obtained before the muscle function assessment. The HSCSP and HSJD Ethics Committees approved the study, and all participants signed an informed consent form. All study procedures were performed in accordance with Spanish regulations.

Inclusion criteria for the study were: (1) Diagnosis of DMD or BMD confirmed by the identification of pathogenic variants in the *DMD* gene and (2) willingness to complete muscle function tests, respiratory assessment, and daily life activities scale.

Functional Assessment

Muscle function tests were performed by physiotherapists with considerable experience in neuromuscular disorders. We assessed patients using timed tests, functional ability scales, and measurement of muscle strength. Timed tests included the 6MWT, the 10 Meter Run/Walk test (10MWT), the Time to Climb Up (Tup4) and Down (Tdo4) Four Steps and the Time to Rise from the Floor (TRF). Functional ability included the NSAA and the Motor Function Measure 20-item scale (MFM-20) (17). The MFM-20 was also analyzed based on its 3 dimensions: D1 (standing and transfers), D2 (axial and proximal), and D3 (distal). PUL test was used to assess upper extremity function in both ambulant and non-ambulant individuals. Egen Klassifikation was used to assess mobility in wheelchair-bound patients (18). Muscle strength was studied using the Medical Research Council scale (MRC). For analysis, 5-point MRC power grades were converted to an 11-point scale as previously described (19). We assessed bilateral shoulder flexion, shoulder abduction, elbow flexion, elbow flexion brachioradialis, wrist extension, wrist flexion, hip adduction, hip abduction,

hip flexion, hip extension, knee extension, knee flexion, ankle eversion, ankle inversion, ankle plantar flexion, and ankle plantar extension. Grip and pinch strength were studied using a hand dynamometer and the best of 3 attempts was used for analysis. Daily life activities were assessed using the ACTIVITY LIMITATIONS scale for patients with upper and/or lower limb impairments (ACTIVLIM) (20). We also assessed respiratory function using the Carefusion Microlab ML 3500 MK8 spirometer (Carefusion, Yorba Linda, CA, USA). We analyzed the Forced Vital Capacity (FVC) while seating and lying and the Forced Expiratory Volume in the first second (FEV1).

Quantification of Growth Factors in Serum Samples

We measured the serum concentration of the following growth factors related with muscle fibrosis: Serum Platelet-Derived Growth Factor BB (PDGF-BB), Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), Platelet-Derived Growth Factor AA (PDGF-AA) and connective tissue growth factor (CTGF). Blood was centrifuged at 1,600 g for 9 min at 4°C. Samples were aliquoted and stored at -80°C until analysis. PDGF-BB and TGF- β 1 levels were measured using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. PDGF-AA human ELISA kit was provided by ThermoFisher (Thermo Fisher Scientific, Nepean, Canada) and CTGF by EIAAB Science Co (Wuhan, China). Minimum detectable cytokine concentrations for these assays were measured to be 1.7 pg/ml for TGF- β 1, 15 pg/ml for PDGF-BB, 40 pg/ml for PDGF-AA and 0.18 ng/ml for CTGF. Samples were measured in duplicate and read on a microplate reader Beckman Coulter AD 340 (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) with AD-LD software.

These growth factors were determined in the 19 DMD patients, 13 BMD patients, 15 patients with mutations in the *DYSF* gene that were being visited in HSCSP (from now on *DYSF* patients) and in 66 healthy controls. The healthy controls were divided into a pediatric group (<15 years old) and adult group (\geq 15 years old). Since the average age of DMD cohort is significantly different from the DMB and *DYSF* cohort, the DMD group was compared to the pediatric control group while the DMB and *DYSF* group was compared to the adult control group.

Muscle MRI

7 DMD and 8 BMD patients underwent thigh muscle MRI in a 1.5T Ingenia MR system (Philips Healthcare, Best, the Netherlands) at HSCSP. Axial 3D FFE Dixon sequence was acquired with the following parameters: TR/TE = 5.78/1.84 ms, flip angle = 15°, voxel size = 1 × 1 × 3 mm and FOV 520 × 340 × 300 mm. Water and fat images were automatically obtained from the Dixon acquisition using a single peak model. One investigator (A.A.-J) estimated fat content in the images using the PRIDE (Philips Research Image Development Environment) tool developed for this purpose. This tool provides the fat fraction (FF), defined as fat/(fat+water). Regions of interest (ROIs) were manually drawn on five slices on the right thigh of the following muscles: *rectus femoris*, *vastus intermedius*, *vastus lateralis*, *vastus medialis*, *adductor magnus*, *sartorius*, *gracilis*, *biceps femoris long*

head, *semitendinosus*, and *semimembranosus*. We intended to include slices of the proximal, middle and distal part of the thigh. To do so, we identified the head of the femur and set the first slice at 5 centimeters below the head. The remaining four slices were distally distributed in the thighs with a separation of 20 slices between them as previously published (21). In patients in which individual muscles in the posterior or anterior compartment of the thigh could not be analyzed due to a complete fat replacement, a ROI was manually drawn over the whole compartment. Neurovascular bundles were avoided. An average of the fat fraction of the 5 slices was calculated for each muscle, and weighted averages were calculated by normalizing the FF by the area of the muscle (bigger muscles had higher weight) to obtain the global thigh FF.

RNA Extraction and Reverse Transcription

Total RNA was extracted from triceps or biceps biopsy samples from 2 healthy controls and 2 DMD patients using RNeasy® Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer's instruction. RNA was quantified using a nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). One μ g of total RNA was reverse-transcribed to complementary DNA (cDNA) using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Real-Time Quantitative PCR Analysis

Real-Time PCR (qPCR) was performed using the TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). All mRNA-specific FAM-labeled primers/probe were purchased from Applied Biosystems. Relative quantification was performed using the comparative Ct method and all results were compared with the control samples. GAPDH was used as endogenous control.

Immunohistochemistry

PDGF-AA immunohistochemistry was performed from paraffinized muscle. The samples were deparaffinized (xylol, absolute ethanol, 95° ethanol, and 70° ethanol), placed in distilled water and pretreated with 10 mM citrate (pH 6) at 100°C. Then samples were washed in PBS and incubated in blocking solution (4% bovine serum albumin). The primary anti-PDGF-AA antibody (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) was then added at room temperature for 1 h. After 3 washes, it was incubated with biotinylated anti-rabbit antibody (Vector Laboratory Inc. Burlingame, CA) for 1 h at room temperature and then avidin-biotin peroxidase complex (Dako, Glostrup, Denmark) was added. Finally, the sections were soaked in Mayer's hematoxylin for 10 s, washed under running water and mounted in the aqueous mounting medium Aquatex (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Data Analysis

Non-parametric tests were used for the statistical analysis as we demonstrated that the distribution of the variables was not uniform as studied using Kolmogorov-Smirnov and did not

follow a normal distribution as studied using Shapiro-Willis test. The Mann-Whitney U test was used to identify significant differences in variables between 2 groups. Non-parametric Kruskal-Wallis test analysis was used to assess differences among 3 groups followed by Dunn's multiple comparison post-test. We used Spearman's rank correlation (coefficient reported as ρ) to investigate any correlation between the serum concentration of growth factors and the results of the muscle function tests, quality of life scales and the thigh FF obtained using Dixon imaging. Correlation coefficients higher than 0.6 were considered good. Because the objective of our research was to explore the possibilities of these growth factors for further studies, we decided not to use multiple comparisons. The results of all statistical studies were considered significant if P -value was lower than 0.05. Statistical studies were performed using IBM SPSS® Statistics software version 21. Graphs were created using Graphpad software and R software.

RESULTS

Cohort Description

A total of 19 patients with DMD (mean age 10 ± 5.6 years), 13 patients with BMD (mean age 31 ± 20.6 years), 15 DYSF patients (mean age 46 ± 18.6 years), 8 pediatric controls (mean age 10 ± 2 years) and 58 adult controls (mean age 43 ± 15.32 years) were enrolled in the study. There was no statistical difference in age between the DMD group and the pediatric controls (Mann-Whitney U -test, $p = 0.979$) and among the BMD, DYSF group and the adult control group (Kruskal-Wallis test, $p = 0.052$). We identified deletions in the *DMD* gene in 71.9% of patients. Duplications accounted for 12.5% of cases and 15.6% were due to point mutations. Among the DMD patients, 13 were ambulant (68.42%) and 6 non-ambulant (31.58%). In the BMD group, 8 patients were ambulant (61.5%) and 5 non-ambulant (38.5%). Five DYSF patients were non-ambulant (33.33%). **Table 1** describes the mean demographic and clinical data of all patients included in the cohort.

Growth Factor Serum Levels Comparison Between DMD, BMD, and Age Matched Controls

Our first aim was to study whether there were differences in growth factor serum levels between DMD, BMD and DYSF patients compared to controls. We compared serum levels of PDGF-AA, PDGF-BB, CTGF, and TGF- β 1 between DMD and pediatric healthy controls whereas BMD and DYSF patients were compared against adult healthy controls (**Figure 1**). In the case of DMD patients, we only observed significant differences in the serum levels of PDGF-AA as shown in **Figure 1A**. The median and IQR of PDGF-AA serum levels were 2245.32 ng/ml (IQR: 1589.94-3832.68) in DMD patients compared to 1242.45 ng/ml (IQR: 915.05-1373.13) in pediatric controls (Mann-Whitney U -test, $p = 0.002$). In the case of BMD and DYSF patients we observed significant differences in the serum levels of CTGF between BMD and adult controls and of TGF- β 1 between BMD and DYSF patients as shown in **Figures 1C,D**. The median

and IQR of CTGF serum levels were 5.66 ng/ml (IQR: 3.82-8.82) in BMD patients compared to 2.37 ng/ml (IQR: 1.35-4.07) in adult controls (Kruskal-Wallis test/Dunn's multiple comparison analysis, $p = 0.004$). The median and IQR of TGF- β 1 serum levels were 59.10 ng/ml (IQR: 51.11-71.51) in BMD patients compared to 40.42 ng/ml (IQR: 28.44-53.75) in DYSF patients (Kruskal-Wallis test/Dunn's multiple comparison analysis, $p = 0.01$). Although PDGF-AA did not show statistical differences, there was a tendency toward increased levels in BMD patients 2415.60 ng/ml (IQR: 1228.59-3981.10) compared to adult controls 1859.62 (IQR: 1363.08-2477.52) (Kruskal-Wallis test/Dunn's multiple comparison analysis, $p = 0.06$).

Correlation of Growth Factor Serum Samples With Muscle Function Test Results

In a second step, we analyzed if there was a correlation between growth factor serum concentration and the results of muscle function tests, spirometry, daily life activities scales and Dixon MRI in DMD and BMD patients. The growth factor that showed a larger number of significant correlations was PDGF-AA as it is shown in **Table 2**. In the case of DMD, PDGF-AA serum levels correlated with the results of the 10MWT, the 6MWT, the MRC scale, and the dimension 3 of the MFM scale. In the case of BMD, PDGF-AA correlated with the results of the 10MWT, the 6MWT, the Tup4, Tdo4, TRF and the NSAA, FVC sitting, FEV1 and the thigh FF. **Figure 2** shows graphs plotting these correlations. Moreover, we analyzed the distribution of PDGF-AA values in relation to age and to the MRC total score and we observed a bell distribution both in DMD and in BMD patients (**Figures 2E,F**). Younger and stronger patients had low levels of PDGF-AA; patients in an intermediate stage that were losing muscle strength had higher levels of PDGF-AA, while patients in the end-stage of the disease, that were very weak or older, had again low levels of PDGF-AA. Muscle strength measured by MRC significantly correlated with TGF- β 1 levels in DMD patients ($p = 0.026$, Spearman's $\rho = 0.523$) and with CTGF levels in BMD patients ($p = 0.012$, Spearman's $\rho = -0.669$). We did not find statistically significant correlations between the PDGF-BB serum levels and the function tests.

PDGF-AA Expression in Skeletal Muscle Biopsies of DMD and BMD Patients

In a final step we studied PDGF-AA expression patterns in muscle biopsies of patients with DMD and BMD and in controls using immunohistochemistry and Real Time PCR. As it has been previously shown, PDGF-AA is expressed in the capillaries in muscles of healthy controls, where it probably has a role in binding the pericytes to the endothelial cell (**Figure 3A**) (22, 23). In patients with DMD, we observed that muscle fibers expressed PDGF-AA as it is shown in **Figure 3B**. qPCR confirmed the results of immunohistochemistry and showed an increased expression of PDGF-AA in muscles from DMD compared to healthy controls (**Figure 3C**).

TABLE 1 | Clinical features of the subjects included in the study.

	Patients				
	DMD	BMD	DYSF	Pediatric controls	Adult controls
Number of patients	19	13	15	8	58
Age (years)	10 ± 5.6	31 ± 20.6	46 ± 18.6	10 ± 2	43 ± 15.32
Non-ambulant	6 (31.58%)	5 (38.5%)	10 (66.7%)	0	0
Ventilator support	1 (5.3%)	2 (15.38%)	1 (6.66%)	0	0
Corticoid treatment	15 (78.94%)	0	0	0	0
qMRI	7 (36.8%)	8 (61.5%)	0	0	0

Age is given as mean ± standard deviation. Frequencies are given as absolute number followed by the percentage in brackets. DMD, Duchenne Muscular Dystrophy; BMD, Becker muscular dystrophy; DYSF, dysferlinopathy; qMRI, quantitative muscle magnetic resonance imaging.

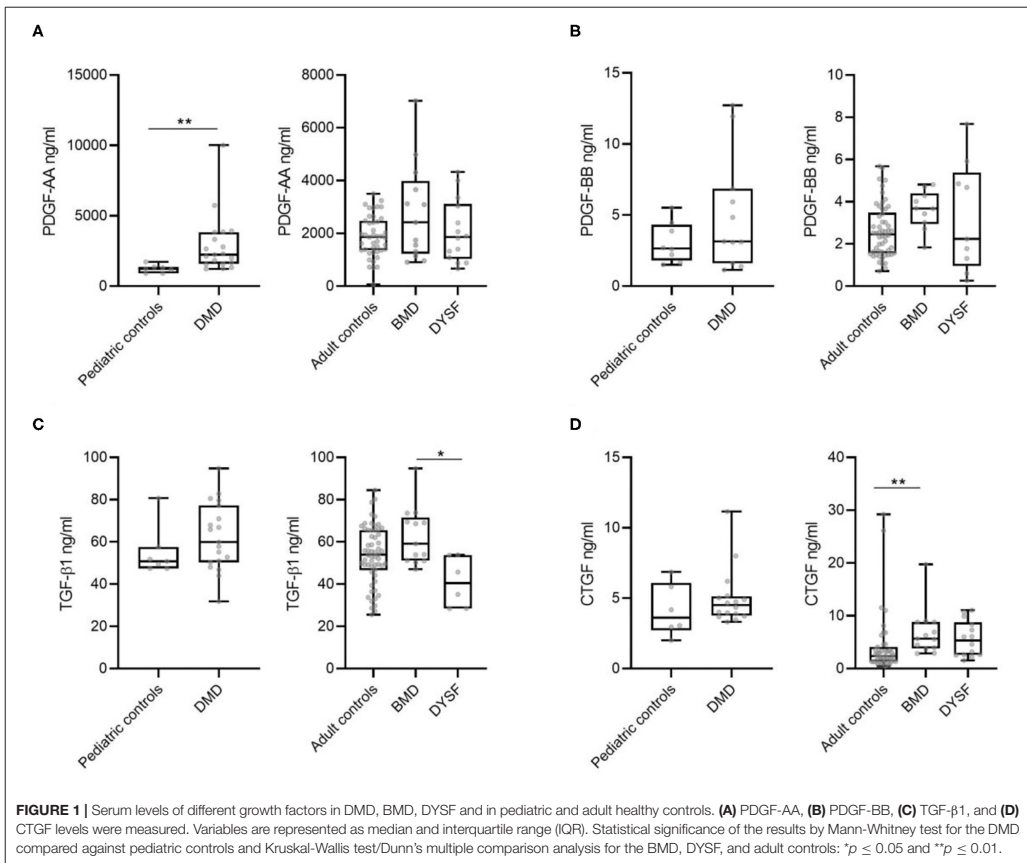


TABLE 2 | Correlation between PDGF-AA serum levels and different muscle function tests, spirometry values, and muscle MRI.

Test	DMD		BMD	
	Correlation coefficient	Spearman ρ -value	Correlation coefficient	Spearman ρ -value
10MWT	0.738	0.037	0.9	0.001
6MWT	-0.637	0.026	-0.929	0.001
Tup4	0.287	0.365	0.9	0.001
Tdo4	0.105	0.746	-0.867	0.012
TRF	0.406	0.191	0.964	0.001
MRCT	-0.537	0.022	-0.398	0.178
Pinch	0.574	0.082	0.452	0.260
Grip	0.676	0.152	0.476	0.233
PUL	0.741	0.205	0.467	0.302
MFM-D3	0.975	0.005	-0.61	0.885
Egen Klasiifikation	-0.700	0.188	0.300	0.625
Activlim	0.521	0.231	-0.287	0.490
NSAA	-0.124	0.717	-0.952	0.001
FVCs%	0.500	0.391	0.738	0.037
FVCi%	0.400	0.505	0.524	0.183
FEV1%	0.800	0.104	0.810	0.015
MRI Thigh FF	-0.179	0.702	-0.786	0.021

Significance was analyzed using Spearman test. 10MWT, 10 meters run/walk test; 6MWT, 6 minutes walking test; Tup4, Time to climb up 4 steps; Tdo4, Time to go down 4 steps; TRF, Time to rise from floor; MRCT, Composite score of the muscle strength calculated using MRC score in both upper and lower limbs; PUL, Performance of the Upper Limb scale; MFM-D3, Motor Function Score 20 items (distal dimension); Activlim, ACTIVITY LIMITations scale; NSAA, North Start Ambulatory Assessment; FVCs%, Force Vital Capacity Percentage Predicted while sitting; FVCi%, Force Vital Capacity Percentage Predicted while lying; FEV1%, Forced expiratory volume in the first second; MRI Thigh FF, fat fraction in thighs.

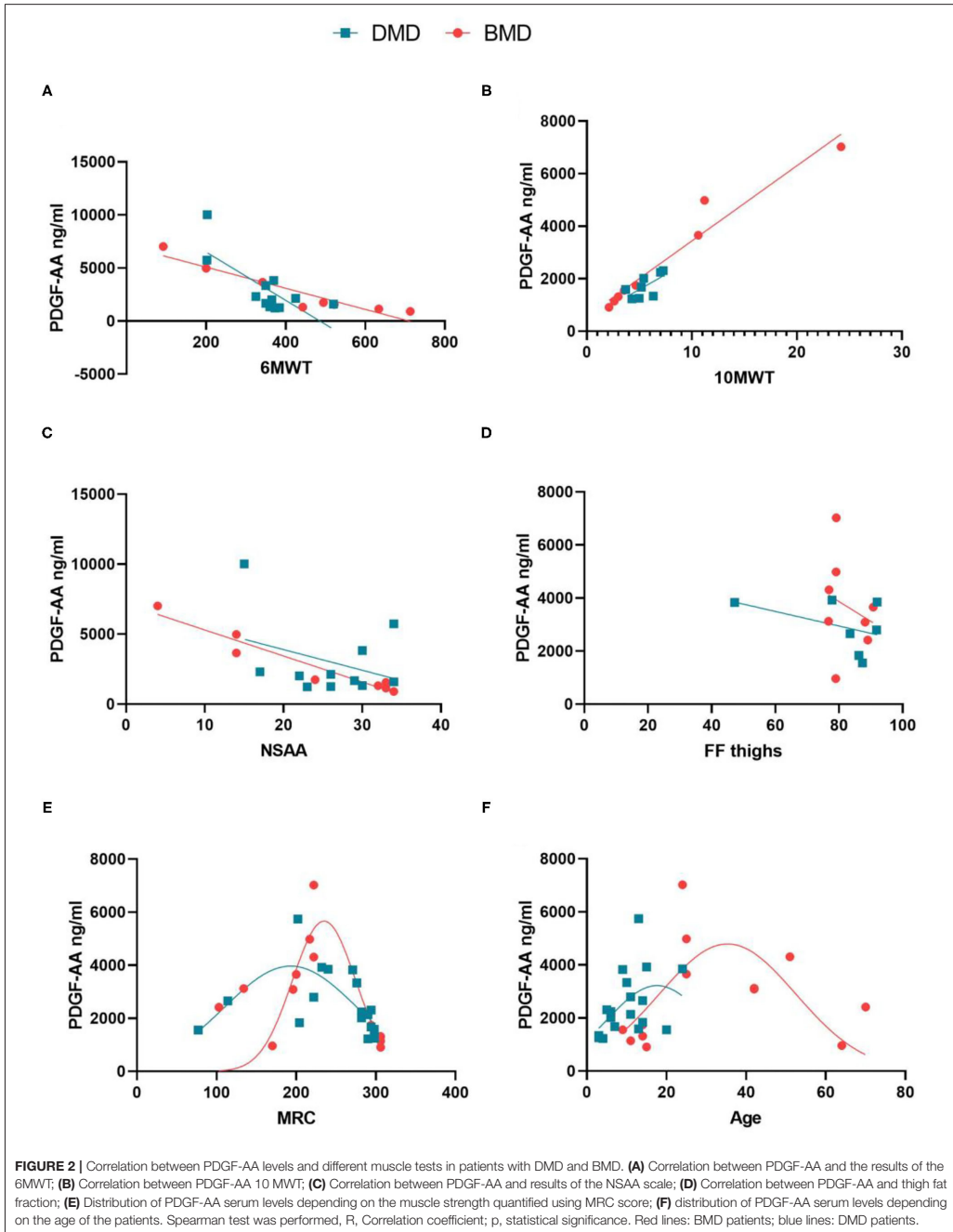
DISCUSSION

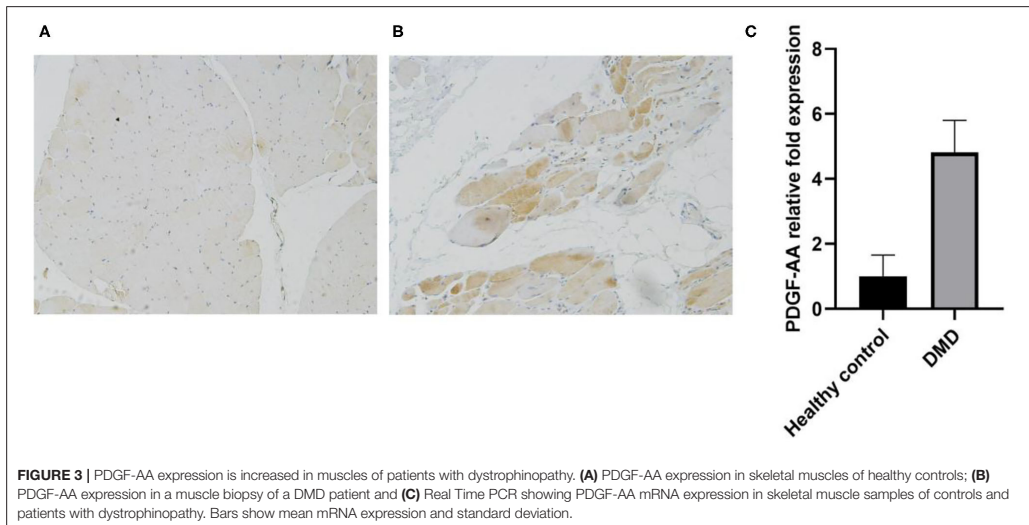
The goal of the work behind this manuscript was to identify serum candidate biomarkers to track progression in DMD and BMD.

The current development of new therapies for muscle dystrophies, partly due to the progress in the field of genetics in the latest decades, raises the need for reliable outcome measures. DMD and BMD are slow progressive diseases where weakness is developed over years. However, clinical trials designed for these disorders must be able to prove presence or absence of effect in a shorter period of time. Biomarkers that can closely track the pathophysiological mechanisms of these diseases, and therefore be used as outcome measures, would be desirable. The research in the field has been centered in two different measurements. On the one hand, qMRI has demonstrated to be a reliable tool to analyze changes in muscle structure in patients with muscular diseases. Fat replacement, assessed using Dixon imaging or spectroscopy could be a suitable outcome measure, because it correlates with muscle function and it is sensitive to changes over short periods in several disorders such as DMD, Pompe or LGMD-2I (7, 15, 24). On the other hand, blood biomarkers are especially interesting because they are easy to obtain. Serum concentration of molecules such as cytokines, metalloproteinases or microRNAs have shown promising results in some neuromuscular diseases (16, 25). Creatine kinase (CK) is a widely accepted biomarker for diagnosis of DMD, BMD and other muscular dystrophies. However, its levels fluctuate and are influenced by different conditions such as physical activity, therefore it is not considered

a good biomarker to study diseases' progression (16). Other molecules present in muscle and involved in the pathophysiology of muscular dystrophies have been studied. For example, Hathout et al. (26) found 44 proteins which were able to differentiate DMD patients from healthy volunteers. Other studies aimed not only to differentiate between patients and controls, but also to correlate with functional state and treatment (27–29) or muscle function tests (30). Fewer manuscripts aim to provide longitudinal data on the suggested biomarkers (31–33).

We were interested in investigating the serum concentration of PDGF-AA, PDGF-BB, CTGF, and TGF β 1 in our patients because of their role in fibrosis. The process of muscle fibrosis in patients with muscular dystrophies is highly complex and not completely understood (34). It is known that chronic muscle degeneration leads to persistent inflammatory infiltration, muscle necrosis and activation of fibroadipogenic progenitor cells (FAPs) and fibroblasts, which release proteins of the extracellular matrix such as collagen-I, leading to the expansion of fibrotic tissue (34–36). The PDGF family in general and PDGF-AA in particular play an important role in this process (22, 37). PDGF-AA is produced by different cell types, such as platelets, muscle fibers or macrophages and acts via the PDGF receptor alpha (PDGFR α) (38). When PDGF-AA binds to its receptor, several signaling pathways involved with cellular proliferation, differentiation and motility are triggered (39). After an acute muscle injury, damaged fibers and inflammatory cells release several cytokines, including PDGF-AA, which activate FAPs inducing the release of extracellular matrix components (40). Extracellular matrix is needed for muscle regeneration as it acts





as a scaffold for muscle fiber regeneration (41). When muscle regeneration is completed, inflammatory cells and the new muscle fibers release TNF- α that promotes apoptosis of FAPs and fibroblasts reducing their number and avoiding the development of fibrosis. At that stage, levels of PDGF-AA decrease (42). However, in dystrophinopathies where there is chronic muscle damage, inflammatory cells permanently infiltrate the injured muscle continuously releasing PDGF-AA, which expand the number of activated FAPs leading to an increased non-controlled fibrotic response (40, 43). Consequently, treatment of murine models of DMD with tyrosine kinase inhibitors that block the PDGFR α such as imatinib, crenolanib and nintedanib, decreased fibrosis and improved muscle function of these animals (40, 42, 44). We think that due to this increased pro-fibrotic response in patients with DMD, the levels of PDGF-AA are high in comparison to controls, as shown in our study.

Other primary fibrotic growth factors including the TGF- β 1 family and CTGF have also been reported to be involved in the process of muscle fibrosis (36, 45, 46). TGF- β 1 and PDGF-BB participate in mesenchymal cell proliferation and fibrotic remodeling (47, 48) and CTGF stimulates chemotaxis and proliferation of fibroblasts and the production of extracellular matrix components (45).

Despite its role in the physiopathology of muscle degeneration, there are only few reports studying the potential utility of growth factors as biomarkers of the disease (49–51).

In our study, the serum concentration of PDGF-AA was increased in patients with DMD in comparison to pediatric controls. There was also an increase in PDGF-AA levels in BMD patients compared to adult controls, although it did not reach statistical significance. Moreover, PDGF-AA serum levels correlated with several muscle function tests both in DMD and

BMD, and with the results of Dixon MRI in BMD. Because of the common underlying pathophysiologic mechanism of both DMD and BMD, we speculate that serum levels of PDGF-AA should be further studied in a larger cohort of DMD/BMD patients and considered as a potential biomarker for the disease.

Our results suggest that the expression of PDGF-AA in DMD and BMD patients follows a bell curve distribution. In initial stages of the disease, when histological changes are consistent with acute muscle damage, PDGF-AA expression by muscle fibers is still low, similarly to that observed in controls. As the disease progresses, muscle fibers degenerate leading to increased production of PDGF-AA that potentially activates FAPs involved in the expansion of fibrotic and adipogenic tissue (22). In advanced stages, when most of the muscle has been replaced by fibrotic and fatty tissue, levels drop again as there are no more muscle fibers releasing PDGF-AA. This hypothesis allows us to understand the results obtained in the correlations between PDGF-AA levels and the muscular function of the patients. Patients in early stages of the disease, in whom muscle strength assessed using the MRC scale is only mildly affected, have low levels of PDGF-AA. These patients in early stages are still able to walk, have high scores on the NSAA, need little time to walk 10 m and cover long distances in the 6MWT. Patients in an intermediate stage of the disease have high levels of PDGF-AA and are clearly weak as it is demonstrated using the MRC scales. These patients are able to cover 200–400 m in the 6MWT, but they still have intact respiratory muscle strength. In contrast, patients in advanced stages of the disease have lower levels of serum PDGF-AA, are extremely weak as assessed with the MRC scale and have higher fat replacement in the muscles. Moreover, these patients are not able to walk and have affected respiratory muscles as shown using the spirometry. Although levels of CTGF

were also increased in BMD patients in comparison to controls, we only found significant correlations with the MRC scale.

The process of fibrosis is not exclusive to muscular tissue. In fact, fibrotic tissue remodeling can affect virtually every system. Both primary fibrotic diseases such as systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis and secondary fibrotic responses in other organs share many commonalities. An initial injury triggers the reparative process in which lymphocytes and macrophages release profibrotic mediators. These mediators promote the activation of myofibroblasts which liberate extracellular matrix proteins leading to structural changes. Therefore, it is not surprising to find that the growth factors that we have studied here are also implicated in other diseases such as atherosclerosis, liver and pulmonary fibrosis, cirrhosis, myocardial infarction and neoplasms (52–58). However, the primary site of injury, the cells that differentiate into myofibroblasts and the organization of the immune response differs among the different types of disorders (52). Interestingly, in our study TGF- β 1 showed a different behavior in BMD than in DYSF patients, since TGF- β 1 levels were increased in BMD patients compared to DYSF patients. In our opinion this data suggests that, although the final stage of the disease may be common among muscular dystrophies, the process leading to replacement of muscle fibers by fibrotic and fatty tissue may have some particularities that could be exclusive to each type of muscular dystrophy, such as the type of muscle injury or the molecular pathways that are activated in response to this muscle injury. However, we did not find significant differences in TGF- β 1 between patients and controls (only between BMD and DYSF patients) and therefore these results should be taken with caution.

The four growth factors that we have studied have been previously related with fibrosis and with muscle regeneration in muscular dystrophies (59, 60) but have also been studied in other neuromuscular diseases. For instance, our group identified a decrease in PDGF-BB levels in patients with Pompe disease suggesting that there is a deficit in muscle regeneration in this disease, and Sato et al. showed that CTGF levels were high in patients with polymyositis and dermatomyositis (61, 62).

This is a small study with several limitations: firstly, it is a transversal study without longitudinal data. Secondly, only half of the patients underwent Dixon MRI, and the ones who did were already severely affected by the disease and therefore had high FF.

Despite these limitations, our study suggests that serum levels of PDGF-AA can differentiate between DMD patients and controls, and that they correlate with the results of different muscle tests. For BMD patients we have also found correlation between PDGF-AA levels and muscle function tests, including fat muscle content assessed by Dixon MRI. Based on these results, we propose PDGF-AA as a growth factor to be further investigated in a larger cohort of patients and in longitudinal studies.

REFERENCES

1. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Brumbaugh D, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Ethics Committee and Hospital de Sant Joan de Deu Ethics Committee. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AA-J, EF-S, and JD-M contributed to the study conception and design. Clinical evaluation of patients was performed by AA-J, JD-M, JA-P, DN-d, CO, and CJ-M. Blood samples and data collection was obtained by SS, EG, JD-M, and EF-S designed and performed the experiments. PP-J, AC-R, and XS-C also collaborated with the execution of the experiments. PM, JD-M, CN-P, and JL designed the MRI protocol. The analysis of the MRI images was performed by AA-J. Functional assessments were performed by IB, IP, CG, and EM. AA-J, EF-S, and JD-M analyzed the results and wrote the manuscript. All authors contributed with their comments to the final version.

FUNDING

This work was supported by FIS PI15/01822 to JD-M and FIS (PI18/1525) to JD-M and XS-C, and FIS (PI19/00122) to CJ-M (Fondo Europeo de Desarrollo Regional [FEDER], Instituto de Salud Carlos III, Spain). XS-C was supported by Sara Borrell postdoctoral fellowship (CD18/00195), Fondo Social Europeo (FSE), Instituto de Salud Carlos III (Spain). Funders did not participate in the study design. This work is generated within the European Reference Network for Neuromuscular diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all the patients and families who participated in the study for their support and patience. We are indebted to the Biobanc de l'Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació integrada in the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement. We thank the MRI technician team for their help. We also thank Mr. John Wilkos for his language advice.

gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol.* (2018) 17:211–2. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30024-3

2. Wallace GQ, McNally EM. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol.* (2009) 71:37–57. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163216

3. Guiraud S, Aartsma-Rus A, Vieira NM, Davies KE, Van Ommen GJB, Kunkel LM. The pathogenesis and therapy of muscular dystrophies. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* (2015) 16:281–308. doi: 10.1146/annurev-genom-090314-025003
4. Flanigan KM. Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurol Clin.* (2014) 32:671–88. doi: 10.1016/j.ncl.2014.05.002
5. Domingos J, Sarkozy A, Scoto M, Muntoni F. Dystrophinopathies and limb-girdle muscular dystrophies. *Neuropediatrics.* (2017) 48:262–72. doi: 10.1055/s-0037-1601860
6. Dowling JJD, Gonorazky H, Cohn RD, Campbell C. Treating pediatric neuromuscular disorders: The future is now. *Am J Med Genet Part A.* (2018) 176:804–41. doi: 10.1002/ajmg.a.38418
7. Barp A, Bello L, Caumo L, Campadello P, Semplicini C, Lazzarotto A, et al. Muscle MRI and functional outcome measures in Becker muscular dystrophy. *Sci Rep.* (2017) 7:16060. doi: 10.1038/s41598-017-16170-2
8. Arora H, Willcocks RJ, Lott DJ, Harrington AT, Senesac CR, Zilke KL, et al. Longitudinal timed function tests in duchenne muscular dystrophy: Imagingdmd cohort natural history. *Muscle Nerve.* (2018) 58:631–8. doi: 10.1002/mus.26161
9. Bello L, Campadello P, Barp A, Fanin M, Semplicini C, Sorarù G, et al. Functional changes in Becker muscular dystrophy: Implications for clinical trials in dystrophinopathies. *Sci Rep.* (2016) 6:32439. doi: 10.1038/srep32439
10. Mazzone ES, Messina S, Vasco G, Main M, Eagle M, D'Amico A, et al. Reliability of the north star ambulatory assessment in a multicentric setting. *Neuromuscul Disord.* (2009) 19:458–61. doi: 10.1016/j.nmd.2009.06.368
11. Schmidt S, Hafner P, Klein A, Rubino-Nacht D, Gocheva V, Schroeder J, et al. Timed function tests, motor function measure, and quantitative thigh muscle MRI in ambulant children with Duchenne muscular dystrophy. A cross-sectional analysis. *Neuromuscul Disord.* (2018) 28:16–23. doi: 10.1016/j.nmd.2017.10.003
12. Long C, Amoasis L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science.* (2016) 351:400–3. doi: 10.1126/science.aad5725
13. Mayhew A, Mazzone ES, Eagle M, Duong T, Ash M, Decoste V, et al. Development of the performance of the upper limb module for duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol.* (2013) 55:1038–45. doi: 10.1111/dmcn.12213
14. Godi C, Ambrosi A, Nicastro F, Previtali SC, Santarosa C, Napolitano S, et al. Longitudinal MRI quantification of muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Clin Transl Neurol.* (2016) 3:607–22. doi: 10.1002/acn3.319
15. Damon BM, Li K, Dortch RD, Welch EB, Park JH, Buck AKW, et al. Quantitative magnetic resonance imaging of skeletal muscle disease. *J Vis Exp.* (2016) 2016:52352. doi: 10.3791/52352
16. Al-Khalili Zsigyarto C, Spitali P. Biomarkers of Duchenne muscular dystrophy: current findings. *Degener Neurol Neuromuscul Dis.* (2018) 8:1–13. doi: 10.2147/dnnd.s121099
17. Bérard C, Payan C, Hodgkinson I, Fermanian J. A motor function measure scale for neuromuscular diseases. Construction and validation study. *Neuromuscul Disord.* (2005) 15:463–70. doi: 10.1016/j.nmd.2005.03.004
18. Fagoaga J, Girabent-Farrés M, Bagur-Calafat C, Febrer A, Steffensen BF. Translation and validation of the Egen Klassifikation scale for the Spanish population: functional assessment for non-ambulatory individuals with Duchenne's muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Rev Neurol.* (2013) 56:555–61. doi: 10.33588/rn.5611.2013106
19. Harris E, Bladen CL, Mayhew A, James M, Bettinson K, Moore U, et al. The clinical outcome study for dysferlinopathy an international multicenter study. *Neurol Genet.* (2016) 2:89. doi: 10.1212/NXG.0000000000000089
20. Bleyenheuft Y, Paradis J, Renders A, Thonnard JL, Arnould C. ACTIVLM-CP a new Rasch-built measure of global activity performance for children with cerebral palsy. *Res Dev Disabil.* (2017) 60:285–94. doi: 10.1016/j.ridd.2016.10.005
21. Figueroa-Bonaparte S, Llauger J, Segovia S, Belmonte I, Pedrosa I, Montiel E, et al. Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: a prospective study. *Sci Rep.* (2018) 8:10898. doi: 10.1038/s41598-018-29170-7
22. Zhao Y, Haginoya K, Sun G, Dai H, Onuma A, Iinuma K. Platelet-derived growth factor and its receptors are related to the progression of human muscular dystrophy: An immunohistochemical study. *J Pathol.* (2003) 201:149–59. doi: 10.1002/path.1414
23. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* (2008) 22:1276–312. doi: 10.1101/gad.1653708
24. Diaz-Manera J, Fernandez-Torron R, LLauger J, James MK, Mayhew A, Smith FE, et al. Muscle MRI in patients with dysferlinopathy: pattern recognition and implications for clinical trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2018) 89:1071–81. doi: 10.1136/jnnp-2017-317488
25. Strandberg K, Ayoglu B, Roos A, Reza M, Nix E, Signorelli M, et al. Blood-derived biomarkers correlate with clinical progression in Duchenne muscular dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* (2020) 7:231–46. doi: 10.3233/JND-190454
26. Hathout Y, Brody E, Clemens PR, Cripe L, DeLisle RK, Furlong P, et al. Large-scale serum protein biomarker discovery in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2015) 112:7153–8. doi: 10.1073/pnas.1507719112
27. Burch PM, Pogoryelova O, Goldstein R, Bennett D, Guglieri M, Straub V, et al. Muscle-derived proteins as serum biomarkers for monitoring disease progression in three forms of muscular dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* (2015) 2:241–55. doi: 10.3233/JND-140066
28. Ayoglu B, Chaouch A, Garcia-Lochmüller H, Politano L, Bertini E, Spitali P, et al. Affinity proteomics within rare diseases: a BIO - NMD study for blood biomarkers of muscular dystrophies. *EMBO Mol Med.* (2014) 6:918–36. doi: 10.15252/emmm.201303724
29. Burch PM, Pogoryelova O, Palandra J, Goldstein R, Bennett D, Fitz L, et al. Reduced serum myostatin concentrations associated with genetic muscle disease progression. *J Neurol.* (2017) 264:541–53. doi: 10.1007/s00415-016-8379-6
30. Anaya-Segura MA, Garcia-Martinez FA, Montes-Almanza LÁ, Diaz BG, Ávila-Ramírez G, Alvarez-Maya I, et al. Non-invasive biomarkers for duchenne muscular dystrophy and carrier detection. *Molecules.* (2015) 20:11154–72. doi: 10.3390/molecules200611154
31. Signorelli M, Ayoglu B, Johansson C, Lochmüller H, Straub V, Muntoni F, et al. Longitudinal serum biomarker screening identifies malate dehydrogenase 2 as candidate prognostic biomarker for Duchenne muscular dystrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* (2020) 11:505–17. doi: 10.1002/jcsm.12517
32. Nadarajah VD, van Putten M, Chaouch A, Garrood P, Straub V, Lochmüller H, et al. Serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a biomarker for monitoring disease progression in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Neuromuscul Disord.* (2011) 21:569–78. doi: 10.1016/j.nmd.2011.05.011
33. Spitali P, Hettne K, Tsonaka R, Charrout M, van den Bergen J, Koeks Z, et al. Tracking disease progression non-invasively in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* (2018) 9:715–26. doi: 10.1002/jcsm.12304
34. Bersini S, Gilardi M, Mora M, Krol S, Arrignoni C, Gandrian C, et al. Tackling muscle fibrosis: From molecular mechanisms to next generation engineered models to predict drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* (2018) 129:64–77. doi: 10.1016/j.addr.2018.02.009
35. Cappellari O, Mantuano P, De Luca A. "The Social Network" and muscular dystrophies: the lesson learnt about the niche environment as a target for therapeutic strategies. *Cells.* (2020) 9:1659. doi: 10.3390/cells9071659
36. Smith LR, Barton ER. Regulation of fibrosis in muscular dystrophy. *Matrix Biol.* (2018) 68–9:602–15. doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.014
37. Piñol-Jurado P, Gallardo E, de Luna N, Suárez-Calvet X, Sánchez-Riera C, Fernández-Simón E, et al. Platelet-derived growth factor BB influences muscle regeneration in duchenne muscle dystrophy. *Am J Pathol.* (2017) 187:1814–27. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.04.011
38. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: Four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2004) 15:197–204. doi: 10.1016/j.cytogr.2004.03.007
39. Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2004) 15:215–28. doi: 10.1016/j.cytogr.2004.03.005
40. Ieronimakis N, Hays A, Prasad A, Janebodin K, Duffield JS, Reyes M. PDGFR α signalling promotes fibrogenic responses in

- collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J Pathol.* (2016) 240:410–44. doi: 10.1002/path.4801
41. Baghdadi MB, Tajbakhsh S. Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration. *Dev Biol.* (2018) 433:200–9. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.07.026
 42. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med.* (2015) 21:786–94. doi: 10.1038/nm.3869
 43. Olson LE, Soriano P. Increased PDGFR α activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell.* (2009) 16:303–13. doi: 10.1016/j.devcel.2008.12.003
 44. Piñol-Jurado P, Suárez-Calvet X, Fernández-Simón E, Gallardo E, De La Oliva N, Martínez-Muriana A, et al. Nintedanib decreases muscle fibrosis and improves muscle function in a murine model of dystrophinopathy. *Cell Death Dis.* (2018) 9:776. doi: 10.1038/s41419-018-0792-6
 45. Moussad EEDA, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab.* (2000) 71:276–92. doi: 10.1006/mgme.2000.3059
 46. Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med.* (2018) 62:44–62. doi: 10.1016/j.mam.2017.11.008
 47. Yablonka-Reuveni Z, Balestreri TM, Bowen-Pope DF. Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by specific isoforms of PDGF. *J Cell Biol.* (1990) 111:1623–9. doi: 10.1083/jcb.111.4.1623
 48. Delaney K, Kasprzycka P, Ciemerych MA, Zimowska M. The role of TGF- β during skeletal muscle regeneration. *Cell Biol Int.* (2017) 41:706–15. doi: 10.1002/cbin.10725
 49. Tsonaka R, Signorelli M, Sabir E, Seyer A, Hettne K, Aartsma-Rus A, et al. Longitudinal metabolomic analysis of plasma enables modeling disease progression in Duchenne muscular dystrophy mouse models. *Hum Mol Genet.* (2020) 29:745–55. doi: 10.1093/hmg/ddz309
 50. Morales MG, Acuña MJ, Cabrera D, Goldschmeding R, Brandan E. The profibrotic connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) correlates with the number of necrotic-regenerative foci in dystrophic muscle. *J Cell Commun Signal.* (2018) 12:413–21. doi: 10.1007/s12079-017-0409-3
 51. Song Y, Yao S, Liu Y, Long L, Yang H, Li Q, et al. Expression levels of TGF- β 1 and CTGF are associated with the severity of duchenne muscular dystrophy. *Exp Ther Med.* (2017) 13:1209–14. doi: 10.3892/etm.2017.4105
 52. Distler JHW, Györfi AH, Ramanujam M, Whitfield ML, Königshoff M, Lafyatis R. Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nat Rev Rheumatol.* (2019) 15:705–30. doi: 10.1038/s41584-019-0322-7
 53. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* (2007) 74:184–95. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.10.002
 54. Kishi M, Aono Y, Sato S, Koyama K, Azuma M, Abe S, et al. Blockade of platelet-derived growth factor receptor- β , not receptor- α ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *PLoS ONE.* (2018) 13:e0209786. doi: 10.1371/journal.pone.0209786
 55. Roskoski R. The role of small molecule platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) inhibitors in the treatment of neoplastic disorders. *Pharmacol Res.* (2018) 129:65–83. doi: 10.1016/j.phrs.2018.01.021
 56. Shamsdin SA, Mehrafshan A, Rakei SM, Mehrabanilare D. Evaluation of VEGF, FGF and PDGF and serum levels of inflammatory cytokines in patients with glioma and meningioma in Southern Iran. *Asian Pacific J Cancer Prev.* (2019) 20:2883–90. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.10.2883
 57. Ulloa-Padilla JR, Ghassibi MP, Dubovy SR, Kerr DA. Clinicopathologic correlation of kaposi sarcoma involving the ocular adnexa: immunophenotyping of diagnostic and therapeutic targets. *Ophthalm Plast Reconstr Surg.* (2020) 36:185–90. doi: 10.1097/IOP.0000000000001506
 58. Kurys-Denis E, Prystupa A, Luchowska-Kocot D, Krupski W, Bis-Wencel H, Panasiuk L. PDGF-BB homodimer serum level – A good indicator of the severity of alcoholic liver cirrhosis. *Ann Agric Environ Med.* (2020) 27:80–5. doi: 10.26444/aaem/115997
 59. Morales MG, Gutierrez J, Cabello-Verrugio C, Cabrera D, Lipson KE, Goldschmeding R, et al. Reducing CTGF/CCN2 slows down mdx muscle dystrophy and improves cell therapy. *Hum Mol Genet.* (2013) 22:4938–51. doi: 10.1093/hmg/dd3352
 60. Ceco E, Bogdanovich S, Gardner B, Miller T, DeJesus A, Earley JU, et al. Targeting latent TGF β release in muscular dystrophy. *Sci Transl Med.* (2014) 6:259ra144. doi: 10.1126/scitranslmed.3010018
 61. Fernández-Simón E, Carrasco-Rozas A, Gallardo E, Figueroa-Bonaparte S, Belmonte I, Pedrosa I, et al. PDGF-BB serum levels are decreased in adult onset Pompe patients. *Sci Rep.* (2019) 9:1–10. doi: 10.1038/s41598-018-38025-0
 62. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol.* (2000) 27:149–54.

Conflict of Interest: PM is employed by the company Philips Healthcare Iberia.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Alonso-Jiménez, Fernández-Simón, Natera-de Benito, Ortiz, García, Montiel, Belmonte, Pedrosa, Segovia, Piñol-Jurado, Carrasco-Rozas, Suárez-Calvet, Jimenez-Mallebrera, Nascimento, Llauger, Nuñez-Peralta, Montesinos, Alonso-Pérez, Gallardo, Illa and Díaz-Manera. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4.3. ARTÍCULO 3:

“Different approaches to analyze muscle fat replacement with Dixon MRI in Pompe disease”

Alonso-Jiménez A, Nuñez-Peralta C, Montesinos P, Alonso-Pérez J, García C, Montiel E, Belmonte I, Pedrosa I, Segovia S, Llauger J, Díaz-Manera J.

Front Neurol. 2021 Jul 8;12:675781. doi: 10.3389/fneur.2021.675781. eCollection 2021.



Different Approaches to Analyze Muscle Fat Replacement With Dixon MRI in Pompe Disease

Alicia Alonso-Jiménez^{1,2}, Claudia Nuñez-Peralta³, Paula Montesinos⁴, Jorge Alonso-Pérez^{1,5}, Carme García⁶, Elena Montiel⁶, Izaskun Belmonte⁶, Irene Pedrosa⁶, Sonia Segovia^{1,5}, Jaume Llauger³ and Jordi Díaz-Manera^{1,5,*}

¹ Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Departament de Medicina, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ² Neuromuscular Reference Center, Neurology Department, University Hospital of Antwerp, Edegem, Belgium, ³ Radiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁴ Philips Healthcare Iberia, Madrid, Spain, ⁵ Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain, ⁶ Rehabilitation and Physiotherapy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁷ John Walton Muscular Dystrophy Research Centre, Newcastle University, International Centre for Life, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

OPEN ACCESS

Edited by:

Massimiliano Filosto,
NeMO-Brescia Clinical Center for
Neuromuscular Diseases, Italy

Reviewed by:

Antonio Toscano,
University of Messina, Italy
Sabrina Ravaglia,
Neurological Institute Foundation
Casimiro Mondino (IRCCS), Italy

*Correspondence:

Jordi Díaz-Manera
jordi.diaz-manera@newcastle.ac.uk

Specialty section:

This article was submitted to
Neuromuscular Disorders and
Peripheral Neuropathies,
a section of the journal
Frontiers in Neurology

Received: 03 March 2021

Accepted: 08 June 2021

Published: 08 July 2021

Citation:

Alonso-Jiménez A, Nuñez-Peralta C, Montesinos P, Alonso-Pérez J, García C, Montiel E, Belmonte I, Pedrosa I, Segovia S, Llauger J and Díaz-Manera J (2021) Different Approaches to Analyze Muscle Fat Replacement With Dixon MRI in Pompe Disease. *Front. Neurol.* 12:675781. doi: 10.3389/fneur.2021.675781

Quantitative MRI is an increasingly used method to monitor disease progression in muscular disorders due to its ability to measure changes in muscle fat content (reported as fat fraction) over a short period. Being able to objectively measure such changes is crucial for the development of new treatments in clinical trials. However, the analysis of the images involved continues to be a daunting task because of the time needed. Whether a more specific analysis selecting individual muscles or a global one analyzing the whole thigh or compartments could be a suitable alternative has only been marginally studied. In our study we compare three methods of analysis of 2-point-dixon images in a cohort of 34 patients with late onset Pompe disease followed over a period of one year. We measured fat fraction on MRIs obtained at baseline and at year 1, and we calculated the increment of fat fraction. We correlated the results obtained with the results of muscle function tests to investigate whether the three methods of analysis were equivalent or not. We observed significant differences between the three methods in the estimation of the fat fraction at both baseline and year 1, but no difference was found in the increment in fat fraction between baseline and year 1. When we correlated the fat fraction obtained with each method and the muscle function tests, we found a significant correlation with most tests in all three methods, although in most comparisons the highest correlation coefficient was found with the analysis of individual muscles. We conclude that the fastest strategy of analysis assessing compartments or the whole thigh could be reliable for certain cohorts of patients where the variable to study is the fat increment. In other sorts of studies, an individual muscle approach seems the most reliable technique.

Keywords: quantitative MRI, Dixon, Pompe, fat replacement, outcome measures

INTRODUCTION

In the past two decades, muscle MRI has been increasingly used for diagnosis of neuromuscular disorders. More recently, quantitative techniques such as Dixon or spectroscopy have been progressively implemented, as they provide the exact amount of fat present in skeletal muscles and can be used to follow up patients (1). In muscle spectroscopy, a region of interest (ROI) is drawn in the muscle when the patients are inside the MRI, and the analysis is only done in that specific region. In the case of Dixon, images are acquired and analyzed later on using specific software. Muscle fat content quantified using muscle MRI correlates with results of muscle function tests (2–4), and therefore, it is considered a good biomarker for neuromuscular diseases. Furthermore, quantitative muscle MRI is able to detect subtle changes in the amount of fat in muscles even before it impacts muscle function (3, 5). Quantitative muscle MRI is reproducible among different centers, and it is also harmless, as it does not use radiation. For its advantages, it has been proposed as a reliable outcome measure for natural history studies and clinical trials (6, 7). However, there is no standardized method to assess the fat content in skeletal muscle MRI acquired using Dixon sequence. Although several software solutions have been proposed to perform automatic or semiautomatic segmentation (8, 9), they are not widely accepted and used, and therefore, the analysis is continued manually, drawing ROIs in selected slices of the muscle. Analysis of Dixon images consumes a lot of time and requires a high degree of expertise and a profound knowledge of the anatomy of the muscles. Additionally, whether evaluating individual muscles is better than assessing compartments or even the whole limb has only been addressed in one study (10). Our aims for this study were as follows: (1) to check if different approaches to the quantification of fat replacement in thigh muscles of a cohort of patients with late-onset Pompe disease (LOPD) studied using Dixon quantitative muscle MRI showed differences at baseline and after 1-year follow-up, (2) to study whether there were significant differences in the increase of fat content after 1-year follow-up depending on the method used to analyze fat replacement, and (3) to identify which method of analysis correlated better with the results of the muscle function tests performed.

MATERIALS AND METHODS

Cohort and Study Design

A total of 34 LOPD patients were included in this study. They were part of a larger prospective observational study following up LOPD patients registered in the webpage ClinicalTrials.gov with the identifier NCT01914536 (11). Inclusion criteria for the study were as follows: (1) diagnosis of LOPD based on recommendations recently proposed by the European Pompe Consortium (12) and reduced enzymatic activity in leukocytes, fibroblasts, or skeletal muscle and/or the presence of two mutations in the GAA gene; (2) no contraindications to MRI; and (3) willingness to complete all muscle function tests, respiratory assessment, and patient-reported outcome measures.

We collected the following epidemiological and clinical data: date of birth, gender, age at diagnosis, time of evolution of the disease, gene mutations, age at start of enzyme replacement therapy (ERT) treatment, current disease stage (ambulant or non-ambulant), and the need of (non)-invasive ventilation.

Patients were evaluated at baseline and 1 year after (± 2 months). At each visit, muscle function tests and quantitative muscle MRI were performed. All patients provided written informed consent to participate in the study. The HSCSP ethics committee approved the study, and all participants signed an informed consent form. All study procedures were performed in accordance with Spanish regulations.

MRI Acquisition and Analysis

Patients were examined in a 1.5T Ingenia MR system (Philips Healthcare, Best, the Netherlands) at HSCSP. Axial 3D fast field echo (FFE) Dixon sequence was acquired with the following parameters: repetition time/echo time (TR/TE) = 5.78/1.84 ms, flip angle = 15°, voxel size = 1 × 1 × 3 mm and field of view (FOV) 520 × 340 × 300 mm. We used the same position protocol for all patients: a supine position with the legs stretched out.

The percentage of fat in muscle or fat fraction (FF) was calculated with the PRIDE tool (Philips Research Image Development Environment) developed for this purpose. ROIs were manually drawn by one investigator (AA-J) on one slice in the right leg for each patient with three different approaches: firstly, by individual muscles (*rectus femoris*, *vastus intermedius*, *vastus lateralis*, *vastus medialis*, *adductor magnus*, *sartorius*, *gracilis*, *biceps femoris long head*, *semitendinosus*, and *semimembranosus*); secondly, by compartments (anterior compartment including the *rectus femoris*, *vastus intermedius*,

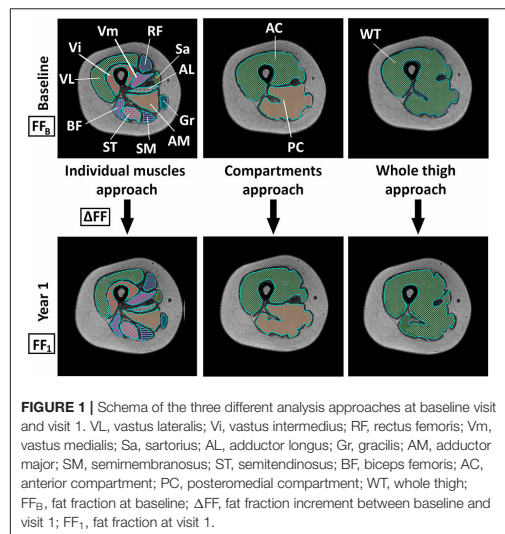


FIGURE 1 | Schema of the three different analysis approaches at baseline visit and visit 1. VL, vastus lateralis; Vi, vastus intermedius; RF, rectus femoris; Vm, vastus medialis; Sa, sartorius; AL, adductor longus; Gr, gracilis; AM, adductor major; SM, semimembranosus; ST, semitendinosus; BF, biceps femoris; AC, anterior compartment; PC, posteromedial compartment; WT, whole thigh; FF_B, fat fraction at baseline; ΔFF, fat fraction increment between baseline and visit 1; FF₁, fat fraction at visit 1.

vastus lateralis, *vastus medialis*, and *sartorius*; and posteromedial compartment including the *adductor magnus*, *gracilis*, *biceps femoris long head*, *semitendinosus*, and *semimembranosus*); and thirdly, including the whole thigh (Figure 1). To obtain the global thigh FF with the first two approaches, weighted averages were calculated by normalizing the FF by the area of the muscle/compartment (bigger muscles had higher weight). All ROIs were drawn in the same slice just below the *biceps femoris short head*. Neurovascular bundles and the femur were avoided. The analysis was performed in MRIs at baseline and after 1-year follow-up.

Muscle Function Tests

All patients were studied by four physiotherapists (IB, CG, EM, and IP) with considerable experience in neuromuscular

disorders at HSCSP in Barcelona. Each patient was examined by the same professional at baseline and after 1 year. The physiotherapists evaluated muscle function using the following tests: the 6-min walking test (6MWT), time to walk 10 m (10MWT), timed up-and-go test (TuGo), time to climb up (Tup4) and down four steps (Tdo4), the motor function measure-20-item scale (MFM20), and the Muscle Research Council (MRC) scale in lower limbs. Patients also completed the self-reported questionnaire ActivLim (portmanteau of “ACTIVity LIMitations”). Global muscle function tests were selected instead of specific muscle tests to correlate with the muscle MRI because our analysis approach measured the global FF of the thigh. We obtained forced vital capacity, both seated and lying down, using the Carefusion Microlab ML 3500 MK8 spirometer (Care Fusion, Yorba Linda, CA, USA).

TABLE 1 | Clinical characteristics of the patients.

Patient	Sex	Age at study (years)	Wheelchair dependent	Phenotype	GAA mutation 1	GAA mutation 2	Age at ERT	Respiratory support
1	F	50	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.1076-1G>C	47	No
2	F	48	Yes	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.2173C>T	37	Yes
3	F	26	No	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	-	No
4	F	63	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.2600_2604delTGCTGinsA	59	No
5	F	47	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.15323c>A	42	No
6	F	51	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.236_246del	47	No
7	M	66	No	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.1933G>T	-	No
8	F	59	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.1637A>G	52	No
9	F	55	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.2173C>T	48	No
10	M	42	No	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.573C>A	39	Yes
11	F	31	Yes	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.1637A>G	24	Yes
12	F	47	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.1192dupC	39	No
13	M	47	No	Muscular + respiratory	c.2173C>T	c.2173C>T	45	Yes
14	M	51	No	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.1657C>T	45	Yes
15	F	51	No	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.1657C>T	46	Yes
16	M	24	No	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1802C>T	-	No
17	M	51	No	HyperCKemia	c.271G>A	c.2510G>A	-	No
18	M	14	No	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.281_282delCT	-	No
19	F	67	No	Muscular	c.1781G>A	c.1194mas5G>A	64	No
20	F	35	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.1A>T	29	No
21	F	40	No	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	-	Yes
22	F	53	No	Muscular	c.1781G>A	c.1194+5G>A	45	No
23	M	66	No	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.2481+102_2646+31del	57	Yes
24	M	8	No	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1889-1G>A	-	No
25	F	57	No	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.1447G>T	55	Yes
26	M	46	No	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.15323c>A	43	Yes
27	M	51	No	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.1933G>T	51	Yes
28	M	51	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.1933G>T	-	No
29	M	43	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.1408a1410delC>T	43	No
30	F	54	No	Muscular	c.-113+2T>A	c.-113+2T>A	48	No
31	M	51	No	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1637A>G	-	Yes
32	M	43	No	Muscular + respiratory	IVS1-13T>G	c.655G>A	-	No
33	F	20	No	HyperCKemia	IVS1-13T>G	c.1551+1G>A	-	No
34	F	41	No	Muscular	IVS1-13T>G	c.1655T>C	40	No

ERT, enzyme replacement therapy.

Statistical Analysis

We used the Shapiro–Wilk-test to check if our variables followed a normal distribution. As they did not, we used non-parametric statistic tests for the analysis. We used the Friedman test to compare the FF and the increment of FF obtained with the three methods of analysis as well as the time necessary to perform the analysis. In case of a global significant effect, pairwise comparisons are performed with Wilcoxon signed-rank tests. We used the paired Wilcoxon signed-rank test to investigate if there were significant changes in the FF obtained between baseline and visit 1. To investigate the correlations between the muscle function tests and FF, we used Spearman’s correlation. We considered that correlations were good if p was lower than 0.05 and the correlation coefficient (ρ) was 0.65 or higher. To investigate whether the differences between the correlations with the three different approaches were significant or not, we used the web utility provided by quantpsy.org (13). Graphs and statistical analysis were performed using IBM® SPSS® Statistics Version 21.

RESULTS

Clinical Features of Patients

We included a total of 34 LOPD patients in this study of whom 19 were women (55.9%) and 15 were men (44.1%). Clinical data of the patients are summarized in **Table 1**. The mean age at first visit was 45.6 years (SD: 14.22 years), and the mean time from onset of symptoms was 14.03 years (SD = 9.47 years). Two patients were homozygous, one for the mutation c.2173C>T and the other one for the mutation c.–113+2T>A. The rest were compound heterozygous. Most patients carried the classical inversion IVS1-13T>G. Seven patients had only hyperCKemia with normal

strength and were considered asymptomatic. Among the 27 symptomatic patients, 14 had exclusively limb muscle weakness, whereas 13 had respiratory and limb muscle involvement. A total of 32 patients were ambulant (two of whom used a walker), and only two needed a manual wheelchair. A total of 23 patients were treated with ERT at the time of the baseline visit.

Differences in Fat Fraction Among the Three Methods of Analysis at Baseline and Visit 1

At baseline, the mean FF of the thigh calculated by analyzing individual muscles and performing then a weighted average (analysis by individual muscles) was 38.98% (SD: 23.58). The FF obtained by analyzing anterior and posteromedial compartment and then doing a weighted average (analysis by compartments) was 39.08 (SD: 22.45). The FF obtained by the whole-thigh approach was 42.48 (SD: 23.55). Friedman’s-test showed that the differences in the average FF among the three methods at baseline were significant ($p \leq 0.001$). Pairwise comparisons showed a significant difference between the analysis by individual muscles and the analysis of the whole thigh, and between the analysis by compartments and the analysis of the whole thigh, but not between analysis by individual muscles and compartments (respectively, $p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p = 0.825$).

At visit 1, the mean FF in the individual muscles analysis was 40.81 (SD: 24.05), by compartments was 40.79 (SD: 23.27), and by the whole thigh was 43.76 (SD: 24.34). These differences were also significant between the analysis by individual muscles and the analysis of the whole thigh, and between the analysis by compartments and the analysis of the whole thigh ($p < 0.001$) and not significant between analyses by individual muscles and compartments (respectively, $p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p = 0.996$).

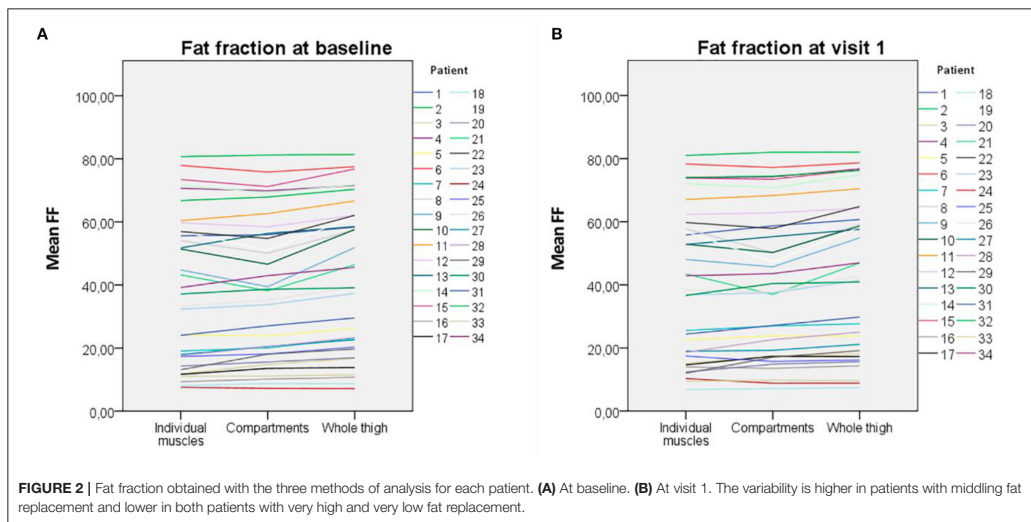


Figure 2 shows the FF obtained with the three methods for each patient of the study.

We measured the time needed to draw the ROIs by each approach in a subset of 15 patients. The mean time per patient to analyze the MRI by individual muscles in both visits was 330.67 s (SD: 22.71), by compartments 179.09 s (SD 12.87), and by the whole thigh 114.7 s (SD 12.97). These differences were significant for the three approaches (Friedman-test, $p < 0.001$).

Fat Fraction Changes After 1 Year of Follow-Up and Differences Among the Three Methods of Analysis

The mean increment in FF, calculated by subtracting the FF at baseline visit from the FF at visit 1, was 1.83% (SD: 2.48) for the individual muscles analysis, 1.71% (SD: 2.68) for the compartments analysis, and 1.28% (SD: 2.44) for the whole-thigh approach. A Wilcoxon signed-rank test showed that this difference in FF between baseline and visit 1 was significant for the three approaches (by individual muscles $Z = -3.462$, $p = 0.001$; by compartments $Z = -3.171$, $p = 0.002$; and by whole thigh $Z = -2.727$, $p = 0.006$). In fact, the mean FF increment was not statistically significantly different among the three methods of analysis (Figure 3).

Correlation With Muscle Function Tests

After our observation that there were statistically significant differences between the three analysis strategies, we wondered whether these differences were clinically significant or not. Correlations between FF and muscle function tests have been previously described in LOPD patients (2). We confirmed that there was a correlation between FF and some muscle function tests and patient-reported outcome measures, which we considered could be affected by fat replacement in the thigh. 10MWT, MRC in lower limbs, MFM20, Tup4, and Tdo4

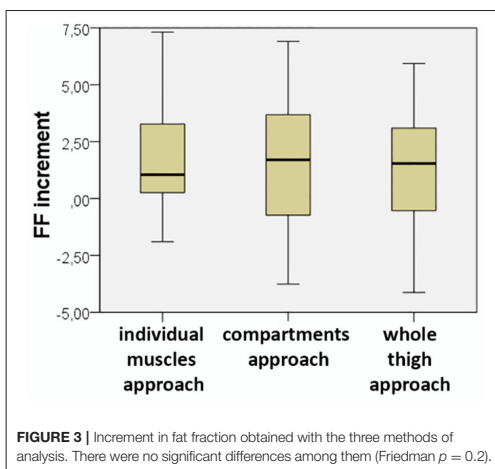
showed strong correlations with the FF both at baseline and at visit 1 with the three methods of analysis (Figure 4). 6MWT and TuGo showed good correlation at visit 1 but not at the baseline. The correlation coefficient was slightly higher in the approach by individual muscles for all the correlations except MRC in lower limbs at visit 1, where the coefficient was slightly higher by whole-thigh analysis (Table 2). We investigated whether these differences among the correlation coefficients were significant or not and found that in eight out of the 13 comparisons with strong correlation coefficients, they were indeed significantly different.

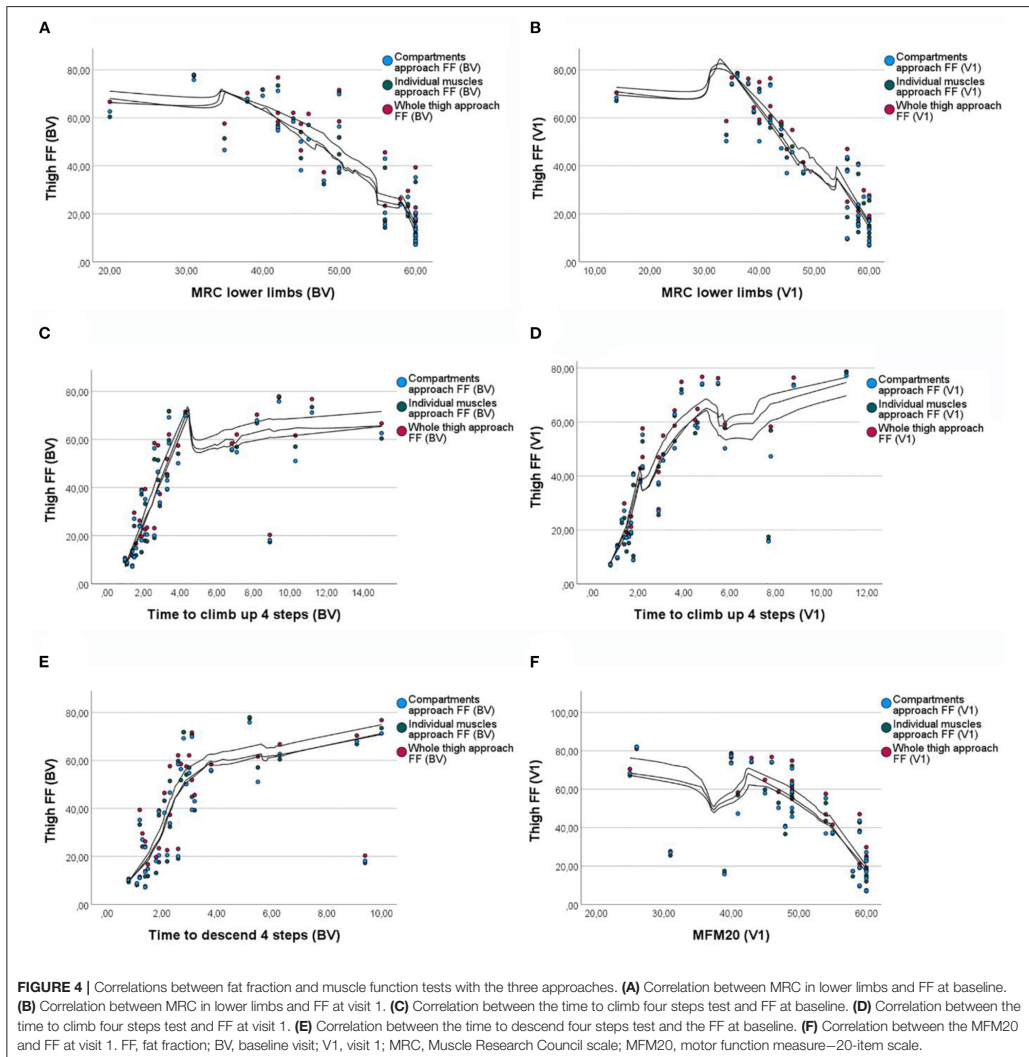
DISCUSSION

In the present paper, we compared three methods of analysis of FF in the thigh in a cohort of LOPD patients. There is no standardized method to perform this analysis to date. In most published studies, analysis is performed by manually drawing ROIs in individual muscles in several slices of the thighs (between three and five in most of the studies), which is highly time-consuming (3, 5, 14, 15). Drawing ROIs over the whole thigh or over the anterior and posteromedial compartments could reduce the time of analysis. Whether these different approaches are clinically or statistically significant has only recently been approached by one group (10). We have shown here that there is a significant difference in the time used between the three strategies: compared with the analysis by individual muscles, it was 45.84% faster when performed by compartments and 65.31% by the whole-thigh approach. In studies involving a large number of MRIs, this difference can mean a lot of hours.

In their study, Reyngoudt et al. (10) performed a comparative analysis of different segmentation approaches in 102 patients with different muscle disorders. They conclude that the increment in FF calculated by global analysis of the whole thigh is reliable in most muscle disorders. Our study supports these findings, as we did not find a significant difference in the increment of FF between the three approaches. The added value of our study is that we compared the three methods of analysis at baseline and visit 1, and we correlated them with muscle function tests. The comparisons between the average FF using the three methods showed statistical differences at both baseline and visit 1. The pairwise comparison showed that the differences were found between the analysis by individual muscles and by the whole thigh, and by compartments and the whole thigh, but not between individual muscles and compartments. Interestingly, the mean FF was higher for the whole-thigh analysis in both visits. We hypothesized that this higher content in fat could be due to intermuscular fat, which can be affected by other variables besides the muscle disease such as the index body mass (16). This could explain the statistically significant difference with the other two approaches.

However, when we looked into each patient in detail (Figure 2), we observed that the variability between the three methods of analysis is higher for patients with intermediate amount of fat replacement (20–60%), whereas patients with





low (<20%) or very high (>60%) fat content tend to be more homogenous. This finding might indicate that in studies with cohorts of patients with very low fat replacement (such as asymptomatic and pauci-symptomatic patients), a more general approach with analysis by compartments of the whole thigh may be appropriated.

We wondered whether the difference in FF between the three methods could also be clinically significant. In order to clarify it, we investigated the correlations between the FF

obtained by each of the methods and muscle function tests and the ActivLim. We found strong correlation coefficients ($\rho \geq 0.65$) between FF and 10MWT, MRC in lower limbs, MFM20, Tup4, and Tdo4 in both visits and 6MWT in visit 1. Although the correlation was found for the three methods of analysis, the coefficient was higher for the individual muscles approach in all but one of the comparisons with a high coefficient. Furthermore, the differences between the correlation coefficients were significant for the majority of functional

TABLE 2 | Correlations between fat fraction and muscle function tests with the three methods of analysis.

Type of analysis	Baseline						Significant difference?	Visit 1						Significant difference?
	By muscles		By compartments		By whole thigh			By muscles		By compartments		By whole thigh		
	ρ	Spearman's rho	ρ	Spearman's rho	ρ	Spearman's rho		ρ	Spearman's rho	ρ	Spearman's rho	ρ	Spearman's rho	
10MWT	0.00	0.8	0.00	0.769	0.00	0.780	Yes	0.00	0.796	0.00	0.738	0.00	0.753	Yes
MRC LL	0.00	-0.885	0.00	-0.866	0.00	-0.881	No	0.00	-0.891	0.00	-0.880	0.00	-0.892	No
MFM20	0.00	-0.681	0.00	-0.656	0.00	-0.661	No	0.00	-0.725	0.00	-0.681	0.00	-0.682	Yes
TuGo	0.039	0.373	0.056		0.054		No	0.00	0.791	0.00	0.729	0.00	0.744	Yes
Tup4	0.00	0.846	0.00	0.822	0.00	0.835	Yes	0.00	0.840	0.00	0.777	0.00	0.805	Yes
Tdo4	0.00	0.764	0.00	0.756	0.00	0.749	No	0.00	0.754	0.00	0.694	0.00	0.716	Yes
6MWT	0.00	-0.658	0.00	-0.634	0.00	-0.641	No	0.00	-0.773	0.00	-0.724	0.00	-0.734	Yes
Activlim	0.00	-0.607	0.00	-0.619	0.00	-0.604	No	0.00	-0.494	0.00	-0.497	0.01	-0.469	No

The highest correlation coefficients have been remarked in bold for each comparison. 10MWT, time to walk 10 m; MRC LL, Muscle Research Council Scale in lower limbs; MFM20, motor function measure—20-item scale; TuGo, timed up-and-go test; Tup4, time to climb up four steps; Tdo4, time to climb down four steps; 6MWT, 6-min walking test; Activlim, Activity Limitations questionnaire.

tests, pointing out that the differences between the different approaches of analysis are not only statistically significant but also clinically relevant.

Our study suggests that, in general, Dixon MRI analysis seems to correlate better with muscle function tests if the manual input is executed by drawing ROIs in individual muscles and obtaining later the global thigh FF with weighted averages. This approach has also the advantage of providing information about individual muscles. Myopathies and muscular dystrophies are characterized by a heterogeneous muscle fat replacement, affecting different muscles in different diseases. Furthermore, the rate of muscle degeneration is not the same for all the muscles: for example, in Pompe disease, the *adductor magnus* is early affected, whereas the *sartorius* or *gracilis* is spared until late stages of the disease. Therefore, the former can be a good muscle to monitor progression at the beginning of the disease, while the latter could be used in late stages.

However, in specific situations, less time-consuming approaches such as drawing ROIs by compartments or in the whole thigh might be used with good reliability, for instance, in cohorts of patients with very low muscle fat replacement. These approaches could also be appropriated if we are interested in quantifying the increment in fat replacement between several visits.

Our study has two main limitations. Firstly, we have studied only patients with Pompe disease; therefore, studies in other type of muscle disorders and muscular dystrophies could show different results. Secondly, we have performed the study only in one slice in the thighs. Analysis of more slices would probably provide a better approximation to the real amount of fat in muscle. Despite its limitations, we think that our study is useful because it approaches both the statistical and clinically significant differences obtained with three different analysis strategies.

In conclusion, the method of analysis used to quantify the fat replacement in muscle using Dixon sequences should be carefully

chosen, taking into account the goal of the study as well as the characteristics of the patients. In transversal studies where the variable to study is the FF, or in subjects with moderate fat replacement, an analysis by individual muscles seems to be more accurate. On the other hand, in longitudinal studies where the variable of interest is the increment in FF, or in cohorts of patients with little fat replacement, a global approach by analyzing compartments or the whole muscle could be more efficient.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors under request, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Hospital de la Santa Creu i Sant Pau ethics committee. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AA-J designed the protocol, visited the patients, analyzed muscle MRIs, and wrote the paper. CN-P collaborated with the design of the protocol, offered technical support for neuroimaging, and contributed to the final version of the paper. JA-P visited the patients and managed the database. JL offered technical support for neuroimaging and reviewed the paper. SS coordinated the study, managed the database, and reviewed the paper. IB, IP, CG, and EM visited the patients, acquired motor function data, and contributed to the final version of the manuscript with their comments. PM offered technical assistance with the MRIs, verified the

quality of the acquired images and contributed to the final version of the manuscript. JD-M designed the protocol, visited the patients, wrote the paper, and obtained funding for the study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Health, Fondos FEDER-ISCIII PI18/1525 to JD-M. The funder did not participate in the study design. This work

is generated within the European Reference Network for Neuromuscular Diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Spanish Association of Patients with Glycogenosis (www.glucogenosis.org) and all the patients who participated in the study for their collaboration and understanding. We thank the MRI technician team for their help. We also thank Kristien Wouters for her support with the statistical analysis and Mr. John Wilkos for his language advice.

REFERENCES

- Núñez-Peralta C, Alonso-Pérez J, Díaz-Manera J. The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases. *Curr Opin Neurol.* (2020) 33:611–20. doi: 10.1097/WCO.0000000000000851
- Figuerola-Bonaparte S, Segovia S, Llauger J, Belmonte I, Pedrosa I, Alejalde A, et al. Muscle MRI findings in childhood/adult onset pompe disease correlate with muscle function. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0163493. doi: 10.1371/journal.pone.0163493
- Willis TA, Hollingsworth KG, Coombs A, Sveen M-L, Andersen S, Stojkovic T, et al. Quantitative magnetic resonance imaging in limb-girdle muscular dystrophy 2I: a multinational cross-sectional study. *PLoS ONE.* (2014) 9:e90377. doi: 10.1371/journal.pone.0090377
- Rooney WD, Berlow YA, Triplett WT, Forbes SC, Willcocks RJ, Wang DJ, et al. Modeling disease trajectory in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* (2020) 94:E1622–33. doi: 10.1212/WNL.00000000000009244
- Núñez-Peralta C, Alonso-Pérez J, Llauger J, Segovia S, Montesinos P, Belmonte I, et al. Follow-up of late-onset Pompe disease patients with muscle magnetic resonance imaging reveals increase in fat replacement in skeletal muscles. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* (2020) 11:1032–46. doi: 10.1002/jcsm.12555
- Dahlqvist JR, Widholm P, Leinhard OD, Vissing J. MRI in neuromuscular diseases: an emerging diagnostic tool and biomarker for prognosis and efficacy. *Ann Neurol.* (2020) 88:669–81. doi: 10.1002/ana.25804
- Carlier PG, Azzabou N, de Sousa PL, Hicks A, Boisserie JM, Amadon A, et al. Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging follow-up of adult Pompe patients. *J Inherit Metab Dis.* (2015) 38:565–72. doi: 10.1007/s10545-015-9825-9
- Ogjer A, Sdika M, Foure A, Le Troter A, Bendahan D. Individual muscle segmentation in MR images: a 3D propagation through 2D non-linear registration approaches. In: *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS (Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.)*. Seogwipo (2017). p. 317–20.
- Li H, Luo H, Liu Y. Paraspinal muscle segmentation based on deep neural network. *Sensors (Switzerland).* (2019) 19:2650. doi: 10.3390/s19122650
- Reyngoudt H, Marty B, Boisserie JM, Le Louër J, Koumako C, Baudin PY, et al. Global versus individual muscle segmentation to assess quantitative MRI-based fat fraction changes in neuromuscular diseases. *Eur Radiol.* (2021) 31:4264–76. doi: 10.1007/s00330-020-07487-0
- Figuerola-Bonaparte S, Llauger J, Segovia S, Belmonte I, Pedrosa I, Montiel E, et al. Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: a prospective study. *Sci Rep.* (2018) 8:10898. doi: 10.1038/s41598-018-29170-7
- van der Ploeg AT, Kruijshaar ME, Toscano A, Laforêt P, Angelini C, Lachmann RH, et al. European consensus for starting and stopping enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year experience. *Eur J Neurol.* (2017) 24:768–e31. doi: 10.1111/ene.13285
- Lee IA, Preacher KJ. *Calculation for the Test of the Difference Between Two Dependent Correlations with One Variable in Common.* Comput Softw. (2013) Available at: <http://quantpsy.org/corrttest/corrttest2.htm> (accessed January 14, 2021).
- Gaeta M, Messina S, Mileto A, Vita GL, Ascenti G, Vinci S, et al. Muscle fat-fraction and mapping in Duchenne muscular dystrophy: evaluation of disease distribution and correlation with clinical assessments preliminary experience. *Skeletal Radiol.* (2012) 41:955–61. doi: 10.1007/s00256-011-1301-5
- Morrow JM, Sinclair CDJ, Fischmann A, Machado PM, Reilly MM, Yousry TA, et al. MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *Lancet Neurol.* (2016) 15:65–77. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00242-2
- Addison O, Marcus RL, Lastayo PC, Ryan AS. Intermuscular fat: a review of the consequences and causes. *Int J Endocrinol.* (2014) 2014:309570. doi: 10.1155/2014/309570

Conflict of Interest: PM is employed by the company Philips Healthcare Iberia.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Alonso-Jiménez, Núñez-Peralta, Montesinos, Alonso-Pérez, García, Montiel, Belmonte, Pedrosa, Segovia, Llauger and Diaz-Manera. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5

RESUMEN
GLOBAL DE LOS
RESULTADOS



Mediante el trabajo recogido en esta tesis hemos explorado la utilidad de la RM como herramienta diagnóstica y de seguimiento en un grupo de miopatías hereditarias.

El objetivo principal de nuestro primer proyecto, recogido en el **artículo 1**, era describir el patrón de afectación muscular en RM en la DOF. Estudios previos en pacientes con esta distrofia habían sugerido que el patrón de infiltración grasa detectado con técnicas de imagen podría ser característico de la enfermedad. En nuestro trabajo nos propusimos corroborar esta afirmación en un grupo grande de pacientes, provenientes de distintas áreas geográficas para evitar el posible sesgo producido por mutaciones regionales.

Para nuestro trabajo reunimos 168 pacientes de 7 países de Europa y Latinoamérica. La edad de inicio de la enfermedad, la distribución por sexos y la sintomatología fue similar a las descritas en otras series.

La mayoría de los pacientes mostraron algún grado de infiltración grasa en su musculatura, incluidos la mitad de los sujetos asintomáticos. La combinación de afectación de la lengua, el *adductor magnus* y el *soleus* resultó ser muy característica de la enfermedad. Otros músculos frecuentemente afectados fueron: en la cintura escapular, el *serratus anterior*; en la musculatura pélvica, el *gluteus medius* y *gluteus maximus*; y en el muslo, el *semimembranosus* y la cabeza larga del *biceps femoris*. En contraste con otras distrofias musculares, un gran número de músculos están preservados o se afectan solamente en estadios muy avanzados de la enfermedad. Es el caso de la musculatura del suelo pélvico, el compartimento anterior del muslo, los miembros superiores o el *gastrocnemius lateralis*. También es atípico en otras distrofias musculares la afectación lingual, la cual sí se ha descrito en la miastenia MUSK y en otras miopatías, como las mitocondriales o la enfermedad de Pompe. Otra característica que parece poco frecuente en otras distrofias es la afectación del músculo soleo de forma aislada en la pierna (que, sin embargo, sí se ha descrito en miopatías miofibrilares). Estas diferencias con otras distrofias musculares probablemente se deban a un mecanismo fisiopatológico diferente: mientras que las LGMD suelen producirse por fallos en la estructura o

funcionamiento de la membrana celular, en la DOF lo que conduce al mal funcionamiento de la fibra es la acumulación de filamentos tubulares en el núcleo.

Nuestros resultados muestran que la RM muscular de cuerpo entero es útil para el diagnóstico de pacientes con DOF, ya que permite diferenciar su patrón de afectación del de otras distrofias musculares.

Además, nuestro estudio mostró que la infiltración grasa se relaciona con el grado de afectación clínica y con el tiempo de evolución de la patología. Los pacientes con una enfermedad más grave mostraron mayor infiltración grasa en las pruebas de imagen. Así mismo, también se detectó mayor grado de infiltración en los pacientes que llevaban más tiempo de evolución desde el inicio de los síntomas. De aquí se infiere que la RM muscular podría ser un biomarcador de progresión de la enfermedad.

El músculo más precozmente afectado fue la lengua, siendo el único afecto en pacientes asintomáticos o con duración de la enfermedad menor a un año. En etapas medias de la enfermedad se afectan: *soleus*, *adductor magnus*, *glutei* y compartimento posterior del muslo.

Llama la atención que la progresión de la infiltración grasa se limita, en general, a un grupo reducido de músculos. Mientras que en otras distrofias el incremento del remplazamiento graso termina por afectar a toda la musculatura, en la DOF una gran cantidad de músculos siguen estando preservados incluso en pacientes clínicamente muy afectados y tras muchos años de evolución de la enfermedad. El porqué algunos músculos son más resistentes que otros a la degeneración es todavía un enigma. Estudios previos han demostrado que las inclusiones nucleares se corresponden con agregados de la proteína PABPN1 mutada, que, sin embargo, solo están presentes en un 4.5 % de las fibras musculares. En el estudio de Périé *et al.*, el cultivo de mioblastos procedentes del músculo cricofaríngeo de pacientes con DOF mostró una alteración de la proliferación, mientras que los cultivos de músculos no afectados (cuádriceps y esternocleidomastoideo) fueron normales. Esto parece indicar que,

por algún motivo todavía por elucidar, el depósito de agregados nucleares y la disfunción de las fibras musculares se da de forma específica en algunos músculos, mientras que otros se encuentran respetados ¹⁷⁵. El hecho, demostrado en nuestro estudio, de que una mayoría de músculos se encuentren preservados concuerda con esta teoría.

Nuestros resultados también sugieren un grupo específico de músculos que podrían ser más útiles para monitorizar la progresión de la enfermedad mediante RM. En las distrofias musculares en general, algunos músculos son reemplazados por grasa de forma muy precoz, por lo que no son útiles para el seguimiento de pacientes a medio y largo plazo puesto que ya se encuentran totalmente infiltrados de grasa. Igualmente, otros músculos no se afectan hasta etapas muy avanzadas y, por lo tanto, no son adecuados para el seguimiento en etapas precoces. Por este motivo nos planteamos qué músculos podrían ser más útiles para el seguimiento de la DOF en el contexto de estudios de historia natural o ensayos clínicos. Para ello correlacionamos la gravedad clínica y el grado de infiltración grasa muscular. Obtuvimos coeficientes de correlación altos para los músculos: *serratus anterior*, *longissimus*, *iliocostalis* y *gluteus minimus*, lo que apunta a estos músculos como posibles dianas de seguimiento.

En este proyecto hemos sido capaces de reunir un gran número de pacientes con una enfermedad poco frecuente como es la DOF. Esto ha sido posible gracias a la colaboración de muchos especialistas de diversos centros. Gracias a esta colaboración el estudio no ha necesitado una gran financiación, lo que pone de manifiesto que la cooperación es esencial para el avance en el estudio de enfermedades de baja prevalencia.

Por otro lado, como ya se ha comentado en la introducción de esta tesis, otros estudios ya habían demostrado una buena correlación entre RM y evolución de la enfermedad. Por lo tanto, se trata de un biomarcador radiológico de progresión de distrofias musculares. En nuestro proyecto reflejado en el **artículo 2** nos propusimos estudiar si las imágenes de RM cuantitativa podrían correlacionarse también con sustancias detectables en el suero.

5 RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

Decidimos estudiar una serie de factores de crecimiento involucrados en el proceso de fibrosis muscular: el TGF- β 1, que se libera durante el proceso de inflamación y estimula la proliferación de fibroblastos; el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), que es activado por el TGF- β 1 y favorece la progresión del proceso fibrogénico; y los PDGF-AA y PDGF-BB, los cuales promueven la transcripción de genes implicados en la proliferación y diferenciación celular, y cuyo papel en la fibrosis muscular había sido explorado previamente por nuestro grupo de investigación^{176,177}.

Nuestro proyecto inicial incluía pacientes con DMD, BMD, disferlinopatías (DYSF) y distrofia facioescapulohumeral (FSH). Lamentablemente, por falta de presupuesto, finalmente no pudimos incluir todos los pacientes planteados en un principio y, de cara a la preparación del artículo centramos el estudio en los pacientes con mutaciones en el gen *DMD*. Los resultados de los demás pacientes, así como la metodología usada para el análisis de las imágenes de RM, se encuentran resumidos en el ***anexo 1***.

Nuestro estudio confirmó la correlación entre RM cuantitativa y pruebas funcionales en las distrofias estudiadas, en concordancia con los hallazgos reportados por otros grupos^{34,35,101-108,48-52,64,93,97}.

Como puede observarse en la ***tabla 2*** del ***Anexo 1***, el porcentaje de grasa, tanto en el muslo como en la pierna, correlaciona con la mayoría de las pruebas funcionales realizadas, mostrando coeficientes de correlación altos (>0.65) en la mayoría de los casos.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. En primer lugar, estamos agrupando distrofias musculares diferentes, en las que probablemente el mecanismo fisiopatológico que conduce a la degeneración del músculo difiere. En segundo lugar, se trata de una cohorte desigual, con mayor número de pacientes con distrofinopatías (7 pacientes con DMD, 8 con BMD, 2 con DYSF y 4 con FSH). Sin embargo, es lógico pensar que, independientemente del mecanismo que inicie el daño muscular, una vez que este es lo suficientemente grave como

para producir sustitución grasa del tejido, la cantidad de tejido muscular contráctil estará reducida, por lo que el rendimiento en las pruebas físicas será peor que en pacientes sanos. Además, cuanto mayor sea este reemplazamiento grasa, peor será la puntuación de los pacientes en dichas pruebas.

Al investigar la relación entre la infiltración grasa en RM en pacientes con distrofinopatías y los factores de crecimiento séricos, obtuvimos una correlación significativa entre el contenido grasa en muslo y los niveles de PDGF-AA en pacientes con BMD.

Estos resultados, no obstante, deben tomarse con cautela, debido al reducido número de pacientes a los que se les realizó la RM y al hecho de que, en la gran mayoría de los casos, la fracción de grasa era muy elevada.

En cuanto a los niveles séricos de los factores de crecimiento, encontramos una correlación lineal entre los niveles de PDGF-AA y algunas de las pruebas funcionales tanto en pacientes con DMD (10MWT, 6MWT, y la tercera dimensión del MFM, que evalúa la función de los miembros superiores) como en BMD (10MWT, 6MWT, Tup4, Tdo4, TRF y NSAA). En estos últimos también encontramos correlación con las pruebas respiratorias (capacidad vital forzada [FVC] y volumen espiratorio forzado [FEV1]). Cuanto mayores son los niveles de PDGF-AA, peor es el rendimiento en las pruebas físicas. Por otro lado, la fuerza medida mediante la escala del Medical Research Council (MRC) y la edad de los pacientes mostraron una correlación no lineal con el PDGF-AA, de forma que los pacientes más fuertes, pero también los más débiles, mostraron niveles bajos, mientras que los pacientes con MRC intermedios tenían niveles altos. De igual modo, los pacientes más jóvenes y los de mayor edad mostraron niveles bajos de PDGF-AA y los pacientes de edades intermedias, niveles altos.

Con estos datos observamos que existe una relación que sigue una curva parabólica entre los niveles de PDGF-AA y la evolución de ambas enfermedades: los pacientes en estadios tempranos de la enfermedad tienen mayor fuerza y niveles de PDGF-AA más bajos, puesto

que el proceso de fibrosis muscular está poco desarrollado. A medida que el daño muscular se acentúa, se elevan los niveles del factor de crecimiento. Sin embargo, en fases avanzadas de la enfermedad, cuando la mayor parte del músculo ha sido sustituido por grasa, el proceso de fibrosis disminuye y, por lo tanto, los niveles de PDGF-AA se reducen.

Durante el desarrollo de este proyecto, y de otros llevados a cabo en nuestra unidad, nos dimos cuenta de lo demandante que resulta el análisis cuantitativo de las imágenes 2-punto Dixon, por lo que nos planteamos si sería posible reducir el tiempo de análisis. Para ello estudiamos resonancias de pacientes con enfermedad de Pompe durante un año de seguimiento mediante tres abordajes diferentes: análisis por músculos individuales, por compartimentos o global. Este trabajo se encuentra recogido en el **artículo 3**. El objetivo era establecer si estos abordajes eran equivalentes o si alguno de los tres era superior a los demás.

Lo primero que observamos es que el porcentaje de grasa muscular obtenido mediante las tres estrategias de análisis no era equivalente.

El abordaje global, analizando todo el muslo, estimó un porcentaje de grasa significativamente superior, tanto en la visita basal como al año de seguimiento. Probablemente esta diferencia se deba al contenido graso intermuscular, que es excluido del análisis por músculos, pero no del análisis más global. Por lo tanto, sí que existen diferencias estadísticas entre realizar el análisis por músculos o compartimentos y realizarlo de forma global. Sin embargo, cabe preguntarse: “estas diferencias estadísticas ¿son clínicamente significativas?”.

Al estudiar la relación entre los métodos de análisis y las pruebas funcionales, los tres mostraron correlaciones significativas con coeficientes de correlación altos.

Pese a ello, los coeficientes obtenidos fueron mayores en el análisis por músculos. Esto indica que, aunque las tres estrategias de análisis pueden ser correctas, parece que un análisis de músculos individuales es más preciso. Posiblemente esta diferencia también sea debida al tejido

graso intermuscular, que queda incluido en el ROI al realizar el estudio por compartimentos o del muslo entero, pero se excluye en el análisis por músculos individuales. Dicho tejido se encuentra rodeando a los músculos (epimisio), y su contenido en grasa no contribuye a la reducción del tejido muscular sano contráctil, por lo que no tendrá repercusión en las pruebas físicas.

Atendiendo a las diferencias en función del grado de infiltración grasa, observamos, como muestra la **figura 2** del **artículo 3**, que la discordancia entre los tres métodos de análisis es mayor en los pacientes que presentan un porcentaje de grasa intermedio, mientras que, en aquellos con poco contenido grasa, así como en los sujetos con gran infiltración, las diferencias fueron considerablemente menores. Esta observación parece indicar que posiblemente en estos grupos de pacientes un análisis global del muslo sea una estrategia adecuada y menos demandante que el análisis por músculos.

Respecto al cambio del contenido grasa entre la visita basal y al año, los tres métodos mostraron un incremento, no habiendo diferencias significativas entre las estrategias de análisis. Esto quiere decir que cualquiera de las tres es adecuada para monitorizar el incremento de infiltración grasa muscular. Posiblemente el tejido grasa intermuscular se mantenga constante durante el tiempo de seguimiento, por lo que incluirlo o excluirlo en el análisis no afectará al incremento de la fracción grasa.

Probablemente una de las conclusiones más relevantes de este proyecto es que las estrategias de análisis global permiten ahorrar tiempo de análisis. En nuestro estudio, el análisis por compartimentos resultó un 46% más rápido que el análisis individual de los músculos. En el caso del análisis global, este porcentaje se elevó hasta el 65%. Por lo tanto, para futuros proyectos con un número moderado o grande de pacientes, si las características de los mismos sugieren que una estrategia global de análisis no acarreará una menor calidad del mismo (por ejemplo, estudios de seguimiento donde el dato a analizar es el incremento de la FF, o en cohortes de pacientes con poco contenido grasa) un análisis global puede significar un importante ahorro de tiempo.

6

RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN



En la presente tesis hemos realizado tres estudios con los que hemos investigado diversas facetas del uso de RM muscular en el diagnóstico y seguimiento de miopatías hereditarias.

En nuestro primer proyecto, reflejado en el **artículo 1**, reunimos neuroimágenes de 168 pacientes (147 RMs y 21 CTs) con DOF, provenientes de 22 centros en 7 países. Utilizando la escala de Mercuri modificada para analizar visualmente las secuencias potenciadas en T1 de RM y las CTs, describimos un patrón de infiltración muscular específico de la DOF. La identificación de patrones de infiltración muscular es de utilidad diagnóstica, ya que permite distinguir la enfermedad de otras con fenotipos similares. También apoya el diagnóstico en casos atípicos. Por ejemplo, Robinson *et al.*¹²⁴ describieron, en una publicación posterior a la nuestra, un paciente con sospecha de DOF para el cual el estudio genético fue negativo. La confirmación de un patrón de afectación de RM compatible con DOF les llevó a estudiar el gen *PABPN1* en profundidad, encontrando una mutación puntual como responsable de la enfermedad, en lugar de la clásica expansión de tripletes. En nuestro artículo también encontramos que la infiltración grasa correlaciona, tanto con la gravedad clínica, como con el tiempo de evolución de la enfermedad, e inferimos un ritmo de progresión de los distintos músculos, siendo la lengua el que primero se afecta, incluso en pacientes pre o paucisintomáticos. Se trata de la cohorte más grande descrita hasta la fecha, combinando datos clínicos, genéticos y de neuroimagen, y más allá de las conclusiones propias del análisis de los datos, refleja cómo la cooperación entre centros puede dar como resultado estudios muy potentes, incluso sin la necesidad de grandes presupuestos.

Tras observar la correlación clínico-radiológica en pacientes con DOF, decidimos investigar otras técnicas de RM como herramienta de seguimiento. Así mismo, nos planteamos si podríamos identificar otros biomarcadores relacionados con el proceso fisiopatológico subyacente que también reflejaran la evolución de la enfermedad. Puesto que el número de pacientes con DOF en nuestro centro era muy reducido, decidimos centrar este nuevo estudio en otras distrofias musculares. Para este proyecto, reflejado en el **artículo 2** y el **anexo 1**, estudiamos factores de crecimiento involucrados en el proceso de fibrosis y remodelado muscular y RM

cuantitativa. Nuestro proyecto inicial incluía pacientes con FSH, DYSF, DMD y BMD, pero finalmente nos enfocamos en las distrofinopatías, ya que era la serie más larga de pacientes estudiados, y además podíamos complementar nuestros datos los procedentes de nuestros colaboradores del Hospital de Sant Joan de Déu en Barcelona. La identificación de sustancias solubles, detectables en una analítica rutinaria, que reflejen la evolución del proceso de degeneración muscular es un objetivo muy deseable. Su identificación permitiría seguir el proceso fisiopatológico mediante sencillas analíticas sanguíneas, lo que supondría una ventaja para los estudios de historia natural y ensayos clínicos. Por otro lado, la RM cuantitativa, mediante técnicas Dixon, entre otras, ha demostrado ser un buen biomarcador radiológico. Por ello, para nuestro estudio nos propusimos intentar correlacionar el contenido graso medido mediante secuencias 2-punto Dixon con factores de crecimiento séricos implicados en el proceso de fibrosis muscular. Entre los factores estudiados, el PDGF-AA fue el que mostró diferencias significativas entre pacientes con DMD y controles, y cuyos niveles correlacionaron con mayor número de pruebas y escalas de función física. En los pacientes con BMD también identificamos numerosas correlaciones con los test físicos, pero la diferencia entre pacientes y controles no alcanzó significancia estadística. Sin embargo en estos pacientes sí que se encontró correlación entre la infiltración grasa de la RM y los niveles de PDGF-AA.

Si bien se trata de un estudio con algunas limitaciones (el número de pacientes es reducido y la RM se realizó solo a un subgrupo), pensamos que abre posibles vías de investigación futuras. Por un lado, el PDGF-AA debería estudiarse en cohortes más grandes de pacientes para perfilar su utilidad potencial, y por otro, debería considerarse la adición de la RM cuantitativa a los estudios de biomarcadores séricos ya que enriquecería los resultados, pues como hemos comentado a lo largo de esta tesis, es capaz de detectar cambios fisiopatológicos antes que las pruebas funcionales.

En el transcurso del estudio nos dimos cuenta de la gran demanda de tiempo que suponía el análisis de las RM por parte del investigador. Esto nos llevó a plantearnos si se podrían utilizar otras estrategias de análisis menos laboriosas. Por ello, planteamos el proyecto

recogido en el **artículo 3** de la presente tesis. En él comparamos 3 maneras diferentes de analizar las imágenes Dixon. El objetivo era identificar estrategias que permitieran reducir el tiempo de análisis. Para ello aprovechamos la cohorte de pacientes con enfermedad de Pompe descrita previamente por nuestro grupo^{58,163,173}. Por un lado, por ser un grupo de pacientes de los cuales disponíamos de pruebas funcionales y RM con secuencias Dixon anuales y, por otro lado, por tratarse de una enfermedad en la que la sustitución grasa es desigual en los distintos compartimentos del muslo. Por esta característica se trataba de un modelo de enfermedad ideal para el proyecto que queríamos llevar a cabo. En nuestro trabajo demostramos que los tres métodos de análisis correlacionaban con las pruebas funcionales, por lo que los tres podrían ser válidos para el seguimiento de pacientes. Si bien los coeficientes de correlación más altos se correspondieron, aun así, con el análisis por músculos individuales, estas diferencias parecían ser significativas solo en los pacientes con FF intermedias, pero no en aquellos con FF bajas o con FF muy altas, indicando que, posiblemente, en estos grupos de pacientes un análisis global más rápido sea igualmente fiable. Pensamos que nuestros resultados pueden ser muy útiles a la hora de planificar estudios de seguimiento con secuencias Dixon, ayudando a encontrar la mejor estrategia de análisis coste-efectiva.



CONCLUSIONES



- ▶ La DOF puede identificarse radiológicamente por su patrón característico y distintivo de infiltración grasa objetivable mediante RM de cuerpo entero. La afectación precoz de la lengua, el músculo aductor mayor y el soleo son muy sugestivos de esta enfermedad.
- ▶ Las técnicas Dixon de RM cuantitativa correlacionan con el estado funcional de los pacientes con DMD y BMD y, por tanto son útiles para el seguimiento. Su uso combinado con la determinación del PDGF-AA podría servir para monitorizar el estado evolutivo de la enfermedad. Deberían llevarse a cabo más estudios para corroborar nuestros resultados.
- ▶ Adaptar la estrategia de análisis para cuantificar la infiltración grasa muscular en pacientes con miopatías hereditarias puede ahorrar hasta un 65% de tiempo de análisis. En los estudios de seguimiento puede utilizarse una estrategia de análisis global del muslo, pero si lo que interesa es conocer la infiltración grasa en un momento concreto, el análisis de músculos individuales parece más adecuado.

8

LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN



Considero que vivimos en un momento muy prometedor para las enfermedades neuromusculares. Por un lado, el acelerado avance de las técnicas de diagnóstico genético está facilitando el aprendizaje sobre la etiología y fisiopatología de las enfermedades musculares. Además, el desarrollo de terapias capaces de modificar la historia natural de enfermedades para las cuales no existían tratamientos específicos ha incrementado el interés por estas patologías, tanto por parte de los clínicos, como de los investigadores, así como por las empresas que financian el desarrollo de nuevos fármacos. Por otro lado, el progreso de la tecnología permite el desarrollo de cada vez mejores técnicas de imagen, con mejor contraste y nitidez, lo que está facilitando el diagnóstico y seguimiento de muchas enfermedades.

Desde hace dos años y medio trabajo en la unidad de enfermedades neuromusculares del Hospital Universitario de Amberes, en Bélgica. Aquí ya se utilizaba la RM muscular desde hace más de 10 años como herramienta diagnóstica y como guía para la biopsia muscular. Sin embargo, su uso en el campo de la investigación estaba muy limitado. En estos dos años hemos actualizado el protocolo de obtención de imágenes y a partir del año que viene esperamos poder implantar técnicas de cuantificación grasa y espectroscopia para el estudio de las miopatías. Hay un gran interés por estas técnicas, no solo dentro de la unidad de enfermedades neuromusculares, sino también por parte del servicio de radiodiagnóstico, por lo que tengo plena confianza en que en un futuro no muy lejano podremos seguir investigando en este campo.

Me gustaría, además, seguir explorando las posibilidades de las nuevas técnicas. Por ejemplo, de las secuencias de difusión. Algunos estudios recientes sugieren que son capaces de mostrar cambios precoces en situaciones de daño muscular^{21,178,179}, lo cual me parece muy prometedor. Por otro lado, también estoy interesada en aprender a realizar ecografía muscular e investigar sus aplicaciones, ya que me parece una herramienta muy versátil y práctica, y poder realizarla en la consulta supone sin duda una gran ventaja.

9

BIBLIOGRAFÍA



1. Cortés Gabaudan F, Ureña Bracero J. Miopatía - Dicciomed: Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico [Internet]. Universidad de Salamanca. [cited 2021 May 10]. Available from: <https://dicciomed.usal.es/palabra/miopatia>
2. Benarroch L, Bonne G, Rivier F, Hamroun D. The 2020 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome).
3. Alan Pestronk M. Neuromuscular Home Page [Internet]. Washington University. [cited 2021 May 10]. Available from: <https://neuromuscular.wustl.edu/>
4. Bonne G, Rivier F, Hamroun D. GeneTable of Neuromuscular Disorders [Internet]. World Muscle Society. [cited 2021 May 11]. Available from: <http://www.musclegenetable.fr/index.html>
5. Yiu EM, Klausegger A, Waddell LB, Grasern N, Lloyd L, Tran K, et al. Epidermolysis bullosa with late-onset muscular dystrophy and plectin deficiency. *Muscle and Nerve*. 2011;44(1):135–41.
6. Bushby KMD, Collins J, Hicks D. Collagen type VI myopathies. *Adv Exp Med Biol*. 2014;802:185–99.
7. Yamamoto T, Hiroi A, Osawa M, Shibata N. The Muscular Dystrophies Associated with Central Nervous System Lesions: A Brief Review from a Standpoint of the Localization and Function of Causative Genes. *Curr Pediatr Rev*. 2015 Feb 27;10(4):282–91.
8. Dubowitz V, A Sewry C, Oldfors A. Chapter 10. Muscular dystrophies and allied disorders I: Duchenne and Becker muscular dystrophy. In: *Muscle Biopsy A practical Approach*. Fourth. Saunders Elsevier; 2013. p. 250–75.
9. Benarroch L, Bonne G, Rivier F, Hamroun D. The 2021 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord*. 2020 Dec 1;30(12):1008–48.
10. Dubowitz V, A Sewry C, Oldfors A. Chapter 18. Metabolic myopathies II: Lipid-Related disorders and mitochondrial myopathies. In: *Muscle Biopsy A practical Approach*. Fourth. Saunders Elsevier; 2013. p. 446–84.
11. Camacho Salas A, Hernández-Laín A. Miopatías Congénitas. In: Gutiérrez-Rivas E, editor. *Manual de enfermedades neuromusculares*. First. Majadahonda (Madrid): Ergon; 2017. p. 453–60.
12. Pardo Fernández J, García Sobrino T, Arias Gómez M, Sobrido Gómez MJ. Canalopatías. In: Gutiérrez-Rivas E, editor. *Manual de enfermedades neuromusculares*. First. Majadahonda (Madrid): Ergon; 2017. p. 429–34.
13. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987 Jul 31;50(3):509–17.
14. Looyen P (PhysicsHigh). Medical Physics. MRI basics - [Video] - YouTube [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 14]. Available from: <https://www.youtube.com/playlist?list=PL5Tk152XIY6SHANbIH-cXldLZvYtKUCAUw>
15. Oleaga Zufría L, Lafuente Martínez J. Monografía SERAM: Aprendiendo los fundamentos de la resonancia magnética. Madrid: Editorial Medica Panamericana; 2007.
16. Albert Einstein College of Medicine. Introducing MRI [Video] YouTube [Internet]. YouTube. 2017 [cited 2021 Aug 14]. Available from: <https://www.youtube.com/playlist?list=PLPclmQzEnT-pz-5TzxyoYSbiAa9xdd89l>

17. Neuroimaging Research Methods (University of Wisconsin Madison). MRI Pulse Sequences for Neuroimaging - [Video] - YouTube [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 14]. Available from: <https://www.youtube.com/channel/UC3LdiRcJe215TvFQkQApMlw>
18. Dixon, Thomas W. Simple Proton Spectroscopic Imaging. *Radiology*. 1984;153:189–94.
19. Pillen S, Van Alfen N. Neuromuscular Imaging. Wattjes MP, Fischer D, editors. Vol. I. New York, NY: Springer New York; 2013. 5–22 p.
20. Díaz-Manera J, Walter G, Straub V. Skeletal muscle magnetic resonance imaging in Pompe disease. *Muscle Nerve*. 2021 May 6;63(5):640–50.
21. Rehmann R, Froeling M, Rohm M, Forsting J, Kley RA, Schmidt-Wilcke T, et al. Diffusion tensor imaging reveals changes in non-fat infiltrated muscles in late onset Pompe disease. *Muscle and Nerve*. 2020;62(4).
22. Jungbluth H, Davis MR, Müller C, Counsell S, Allsop J, Chattopadhyay A, et al. Magnetic resonance imaging of muscle in congenital myopathies associated with RYR1 mutations. *Neuromuscul Disord*. 2004 Dec 1;14(12):785–90.
23. Mercuri E, Lampe A, Allsop J, Knight R, Pane M, Kinali M, et al. Muscle MRI in Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Neuromuscul Disord*. 2005;15(4):303–10.
24. Mercuri E, Clements E, Offiah A, Pichiecchio A, Vasco G, Bianco F, et al. Muscle magnetic resonance imaging involvement in muscular dystrophies with rigidity of the spine. *Ann Neurol*. 2010;67(2):201–8.
25. Mercuri E, Bushby K, Ricci E, Birchall D, Pane M, Kinali M, et al. Muscle MRI findings in patients with limb girdle muscular dystrophy with calpain 3 deficiency (LGMD2A) and early contractures. *Neuromuscul Disord*. 2005 Feb;15(2):164–71.
26. Carlier R, Laforet P, Wary C, Mompoin D. Whole-body muscle MRI in 20 patients suffering from late onset Pompe disease : Involvement patterns. *Neuromuscul Disord*. 2011;21(11):791–9.
27. Sarkozy A, Deschauer M, Carlier RY, Schrank B, Seeger J, Walter MC, et al. Muscle MRI findings in limb girdle muscular dystrophy type 2L. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(SUPPL. 2):122–9.
28. Gómez-Andrés D, Díaz-Manera J, Alejaldre A, Pulido-Valdeolivas I, González-mera L, Olivé M, et al. Muscle imaging in laminopathies: Synthesis study identifies meaningful muscles for follow-up. *Muscle and Nerve*. 2018;58(6):812–7.
29. Tasca G, Monforte M, Ottaviani P, Pelliccioni M, Frusciante R, Laschena F, et al. Magnetic resonance imaging in a large cohort of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients: Pattern refinement and implications for clinical trials. *Ann Neurol*. 2016;79(5):854–64.
30. Harris E, McEntagart M, Topf A, Lochmüller H, Bushby K, Sewry C, et al. Clinical and neuroimaging findings in two brothers with limb girdle muscular dystrophy due to LAMA2 mutations. *Neuromuscul Disord*. 2017 Feb 1;27(2):170–4.
31. Tasca G, Monforte M, Díaz-Manera J, Brisca G, Semplicini C, D'Amico A, et al. MRI in sarcoglycanopathies: A large international cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(1):1–6.
32. Dabaj I, Carlier RY, Gómez-Andrés D, Neto OA, Bertini E, D'Amico A, et al. Clinical and imaging hallmarks of the MYH7-related myopathy with severe axial involvement. *Muscle Nerve*. 2018 Aug 1;58(2):224–34.

33. Diaz-Manera J, Fernandez-Torron R, LLauger J, James MK, Mayhew A, Smith FE, et al. Muscle MRI in patients with dysferlinopathy: pattern recognition and implications for clinical trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;1–11.
34. Tasca G, Iannaccone E, Monforte M, Masciullo M, Bianco F, Laschena F, et al. Muscle MRI in Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(SUPPL. 2):S100–6.
35. Polavarapu K, Manjunath M, Preethish-Kumar V, Sekar D, Vengalil S, Thomas PT, et al. Muscle MRI in Duchenne muscular dystrophy: Evidence of a distinctive pattern. *Neuromuscul Disord*. 2016 Nov 1;26(11):768–74.
36. Mercuri E, Counsell S, Allsop J, Jungbluth H, Kinali M, Bonne G, et al. Selective muscle involvement on magnetic resonance imaging in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuropediatrics*. 2002;33(1):10–4.
37. Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K, et al. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurology*. 2009 Sep 2;71(10):758–65.
38. Kornblum C, Lutterbey G, Bogdanow M, Kesper K, Schild H, Schröder R, et al. Distinct neuromuscular phenotypes in myotonic dystrophy types 1 and 2: A whole body highfield MRI study. *J Neurol*. 2006;253(6):753–61.
39. Carboni N, Mura M, Marrosu G, Cocco E, Marini S, Solla E, et al. Muscle imaging analogies in a cohort of patients with different clinical phenotypes caused by LMNA gene mutations. *Muscle and Nerve*. 2010;41(4):458–63.
40. Wattjes MP, Kley RA, Fischer D. Neuromuscular imaging in inherited muscle diseases. *Eur Radiol*. 2010;
41. Leung DG. Magnetic resonance imaging patterns of muscle involvement in genetic muscle diseases: a systematic review. *J Neurol*. 2017;264(7):1320–33.
42. ten Dam L, van der Kooi AJ, Verhamme C, Wattjes MP, de Visser M. Muscle imaging in inherited and acquired muscle diseases. *Eur J Neurol*. 2016;23(4):688–703.
43. Straub V, Carlier PG, Mercuri E. TREAT-NMD workshop: Pattern recognition in genetic muscle diseases using muscle MRI. *Neuromuscul Disord*. 2012 Oct 1;22:S42–53.
44. Díaz-Manera J, LLauger J, Gallardo E, Illa I. Muscle MRI in muscular dystrophies. *Acta Myol myopathies cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol*. 2015;34(2–3):95–108.
45. Verdú-Díaz J, Alonso-Pérez J, Nuñez-Peralta C, Tasca G, Vissing J, Straub V, et al. Accuracy of a machine learning muscle MRI-based tool for the diagnosis of muscular dystrophies. *Neurology*. 2020 Mar 10;94(10):e1094–102.
46. Yang M, Zheng Y, Xie Z, Wang Z, Xiao J, Zhang J, et al. A deep learning model for diagnosing dystrophinopathies on thigh muscle MRI images. *BMC Neurol*. 2021 Dec 1;21(1).
47. Mercuri E, Cini C, Counsell S, Allsop J, Zolkipli Z, Jungbluth H, et al. Muscle MRI findings in a three-generation family affected by Bethlem myopathy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2002;6(6):309–14.
48. Velde NM van de, Hooijmans MT, Mishre ASDS, Keene KR, Koeks Z, Veeger TTJ, et al. Selection Approach to Identify the Optimal Biomarker Using Quantitative Muscle MRI and Functional Assessments in Becker Muscular Dystrophy. *Neurology*. 2021 Aug 3;97(5):e513–22.

49. Godi C, Ambrosi A, Nicastro F, Previtali SC, Santarosa C, Napolitano S, et al. Longitudinal MRI quantification of muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016 Aug 1;3(8):607–22.
50. Bonati U, Schmid M, Hafner P, Haas T, Bieri O, Gloor M, et al. Longitudinal 2-point dixon muscle magnetic resonance imaging in becker muscular dystrophy. *Muscle and Nerve*. 2015 Jun 1;51(6):918–21.
51. Wary C, Azzabou N, Giraudeau C, Louër J Le, Montus M, Voit T, et al. Quantitative NMRI and NMRS identify augmented disease progression after loss of ambulation in forearms of boys with Duchenne muscular dystrophy. *NMR Biomed*. 2015 Sep 1;28(9):1150–62.
52. Willcocks RJ, Rooney WD, Triplett WT, Forbes SC, Lott DJ, Senesac CR, et al. Multicenter prospective longitudinal study of magnetic resonance biomarkers in a large duchenne muscular dystrophy cohort. *Ann Neurol*. 2016 Apr;79(4):535–47.
53. Carlier PG, Azzabou N, de Sousa PL, Hicks A, Boisserie JM, Amadon A, et al. Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging follow-up of adult Pompe patients. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(3).
54. Figueroa-Bonaparte S, Llauger J, Segovia S, Belmonte I, Pedrosa I, Montiel E, et al. Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: a prospective study. *Sci Rep*. 2018 Jul;8(1):10898.
55. Nuñez-Peralta C, Alonso-Pérez J, Llauger J, Segovia S, Montesinos P, Belmonte I, et al. Follow-up of late-onset Pompe disease patients with muscle magnetic resonance imaging reveals increase in fat replacement in skeletal muscles. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020;(December 2019):1032–46.
56. Willis TA, Hollingsworth KG, Coombs A, Svein ML, Andersen S, Stojkovic T, et al. Quantitative Muscle MRI as an Assessment Tool for Monitoring Disease Progression in LGMD2I: A Multicentre Longitudinal Study. Cohn R, editor. *PLoS One*. 2013 Aug 14;8(8):e70993.
57. Andersen G, Dahlqvist JR, Vissing CR, Heje K, Thomsen C, Vissing J. MRI as outcome measure in facioscapulohumeral muscular dystrophy: 1-year follow-up of 45 patients. *J Neurol*. 2017 Mar 1;264(3):438–47.
58. Nuñez-Peralta C, Alonso-Pérez J, Llauger J, Segovia S, Montesinos P, Belmonte I, et al. Follow-up of late-onset Pompe disease patients with muscle magnetic resonance imaging reveals increase in fat replacement in skeletal muscles. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020;(January):1032–46.
59. Morrow JM, Sinclair CDJ, Fischmann A, Machado PM, Reilly MM, Yousry TA, et al. MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *Lancet Neurol*. 2016 Jan;15(1):65–77.
60. Ricotti V, Evans MRB, Sinclair CDJ, Butler JW, Ridout DA, Hogrel J-Y, et al. Upper Limb Evaluation in Duchenne Muscular Dystrophy: Fat-Water Quantification by MRI, Muscle Force and Function Define Endpoints for Clinical Trials. *PLoS One*. 2016;
61. Fischmann A, Hafner P, Studler U, Fischer D. Quantitative MRI can detect subclinical disease progression in muscular dystrophy. 2012;1648–54.

62. Martel-Duguech L, Alonso-Jiménez A, Bascuñana H, Díaz-Manera J, Llauger J, Nuñez-Peralta C, et al. Thigh muscle fat infiltration is associated with impaired physical performance despite remission in Cushing's syndrome. Vol. 105, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. J Clin Endocrinol Metab; 2020.
63. Martel-Duguech L, Alonso-Pérez J, Bascuñana H, Díaz-Manera J, Llauger J, Nuñez-Peralta C, et al. Intramuscular fatty infiltration and physical function in controlled acromegaly. *Eur J Endocrinol*. 2021 Jul 1;185(1):167–77.
64. Fischmann A, Hafner P, Gloor M, Schmid M, Klein A, Pohlman U, et al. Quantitative MRI and loss of free ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol*. 2013;260(4):969–74.
65. Ogier A, Sdika M, Foure A, Le Troter A, Bendahan D. Individual muscle segmentation in MR images: A 3D propagation through 2D non-linear registration approaches. In: *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.; 2017. p. 317–20.
66. Li H, Luo H, Liu Y. Paraspinal muscle segmentation based on deep neural network. *Sensors (Switzerland)*. 2019;
67. Warman-Chardon J, Diaz-Manera J, Tasca G, Straub V. 247th ENMC International Workshop: Muscle magnetic resonance imaging - Implementing muscle MRI as a diagnostic tool for rare genetic myopathy cohorts. Hoofddorp, The Netherlands, September 2019. In: *Neuromuscular Disorders*. Elsevier Ltd; 2020. p. 938–47.
68. Jansen M, van Alfen N, Nijhuis van der Sanden MWG, van Dijk JP, Pillen S, de Groot IJM. Quantitative muscle ultrasound is a promising longitudinal follow-up tool in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(4):306–17.
69. Mul K, Horlings CGC, Vincenten SCC, Voermans NC, Engelen BGM Van. Quantitative muscle MRI and ultrasound for facioscapulohumeral muscular dystrophy : complementary imaging biomarkers. *J Neurol*. 2018;265(11):2646–55.
70. Rajula RR, Saini J, Unnikrishnan G, Vengalil S, Nashi S, Bardhan M, et al. Muscle ultrasonography in detecting fasciculations: A noninvasive diagnostic tool for amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Ultrasound*. 2021;
71. Visser LH. High-resolution power doppler sonography in inflammatory myopathy. *Muscle and Nerve*. 2009;39(4):553–4.
72. Pillen S, Arts IMP, Zwartz MJ. Muscle ultrasound in neuromuscular disorders. *Muscle and Nerve*. 2008;37(6):679–93.
73. Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases-A world survey. *Neuromuscul Disord*. 1991;1(1):19–29.
74. Thangarajh M. The Dystrophinopathies. *Continuum (Minneap Minn)*. 2019;25(6):1619–39.
75. Flanigan KM. Duchenne and becker muscular dystrophies. Vol. 32, *Neurologic Clinics*. W.B. Saunders; 2014. p. 671–88.
76. Drachman DB, Toyka K V., Myer E. Prednisone in Duchenne Muscular Dystrophy. *Lancet*. 1974;304(7894):1409–12.

77. Henricson EK, Abresch RT, Cnaan A, Hu F, Duong T, Arrieta A, et al. The cooperative international neuromuscular research group Duchenne natural history study: Glucocorticoid treatment preserves clinically meaningful functional milestones and reduces rate of disease progression as measured by manual muscle testing and other commonly used clinical trial outcome measures. *Muscle and Nerve*. 2013 Jul 1;48(1):55–67.
78. McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Duong T, Joyce NC, Hu F, et al. Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. *Lancet*. 2018;391(10119):451–61.
79. Shieh PB. *Emerging Strategies in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy*. Vol. 15, Neurotherapeutics. Springer New York LLC; 2018. p. 840–8.
80. Bushby K, Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, et al. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle and Nerve*. 2014;50(4):477–87.
81. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, Roush K, Bird L, Lowes LP, et al. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2013;74(5):637–47.
82. McDonald CM, Henricson EK, Han JJ, Abresch RT, Nicorici A, Elfring GL, et al. The 6-minute walk test as a new outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2010 Apr 1;41(4):500–10.
83. Consalvi S, Saccone V, Mozzetta C. Histone deacetylase inhibitors: A potential epigenetic treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Epigenomics*. 2014;6(5):547–60.
84. Clarke A, Johnson M, Harris JB. Improved diagnosis of becker muscular dystrophy by dystrophin testing. *Neurology*. 1989;39(8):1011–7.
85. Nakamura A. X-Linked Dilated Cardiomyopathy: A Cardiospecific Phenotype of Dystrophinopathy. *Pharmaceuticals*. 2015 Jun 9;8(2):303.
86. Hoogerwaard EM, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC, Majoer-Krakauer DF, Leschot NJ, et al. Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in the Netherlands: A cohort study. *Lancet*. 1999 Jun 16;353(9170):2116–9.
87. Hoogerwaard EM, Van Der Wouw PA, Wilde AAM, Bakker E, Ippel PF, Oosterwijk JC, et al. Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 1999 Jul 1;9(5):347–51.
88. Mazzone ES, Messina S, Vasco G, Main M, Eagle M, D’Amico A, et al. Reliability of the North Star Ambulatory Assessment in a multicentric setting. *Neuromuscul Disord*. 2009 Jul;19(7):458–61.
89. Mazzone E, Martinelli D, Berardinelli A, Messina S, D’Amico A, Vasco G, et al. North Star Ambulatory Assessment, 6-minute walk test and timed items in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2010 Nov;20(11):712–6.
90. Mayhew A, Cano SJ, Scott E, Eagle M, Bushby K, Manzur A, et al. Detecting meaningful change using the North Star Ambulatory Assessment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol*. 2013 Nov;55(11):1046–52.
91. Mcdonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Florence J, Eagle M, Gappmaier E, et al. The 6-minute walk test and other clinical endpoints in duchenne muscular dystrophy: reliability, concurrent validity, and minimal clinically important differences from a multicenter study. *Muscle Nerve*. 2013 Sep;48(3):357–68.

92. Nelson LL, Iannaccone ST. Clinical outcome assessments in Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy: past, present and future. 2021;
93. Schmidt S, Hafner P, Klein A, Rubino-Nacht D, Gocheva V, Schroeder J, et al. Timed function tests, motor function measure, and quantitative thigh muscle MRI in ambulant children with Duchenne muscular dystrophy. A cross-sectional analysis. *Neuromuscul Disord*. 2018 Jan;28(1):16–23.
94. Mayhew A, Mazzone ES, Eagle M, Duong T, Ash M, Decostre V, et al. Development of the Performance of the Upper Limb module for Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol*. 2013;55(11):1038–45.
95. Spitali P, Hettne K, Tsonaka R, Charrouf M, van den Bergen J, Koeks Z, et al. Tracking disease progression non-invasively in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018;9(4):715–26.
96. Al-Khalili Szgyarto C, Spitali P. Biomarkers of Duchenne muscular dystrophy: current findings. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*. 2018;Volume 8:1–13.
97. Gin-Chung L, Yuh-Jyh J, Chi-Hsiun C, Twei-Shiun J. Duchenne Muscular Dystrophy: MR grading System with Functional Correlation. *Radiology*. 1993;186(183):475–80.
98. Alic L, Griffin JF, IV, Eresen A, Kornegay JN, Ji JX. Using MRI to quantify skeletal muscle pathology in Duchenne muscular dystrophy: A systematic mapping review. *Muscle Nerve*. 2021 Jul 1;64(1):8.
99. Finanger EL, Russman B, Forbes SC, Rooney WD, Walter GA, Vandeborne K. Use of skeletal muscle MRI in diagnosis and monitoring disease progression in Duchenne Muscular Dystrophy. *Phys Med Rehabil Clin NA*. 2012;23(1):1–12.
100. Mathur S, Lott DJ, Senesac C, Germain SA, Vohra RS, Lee Sweeney H, et al. Age-Related Differences in Lower-Limb Muscle Cross-Sectional Area and Torque Production in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy HHS Public Access. *Arch Phys Med Rehabil*. 2010;91(7):1051–8.
101. Wren TAL, Bluml T, Tseng-Ong L, Gilsanz V. Three-point technique of fat quantification of muscle tissue as a marker of disease progression in Duchenne muscular dystrophy: preliminary study. *AJR Am J Roentgenol*. 2008;190(1):8–12.
102. Sherlock SP, Zhang Y, Binks M, Marraffino S. Quantitative muscle MRI biomarkers in Duchenne muscular dystrophy: Cross-sectional correlations with age and functional tests. *Biomark Med*. 2021;15(10):761–73.
103. Kim HK, Laor T, Horn PS, Racadio JM, Wong B, Dardzinski BJ. T2 mapping in Duchenne muscular dystrophy: Distribution of disease activity and correlation with clinical assessments. *Radiology*. 2010;255(3):899–908.
104. Gaeta M, Messina S, Mileto A, Vita GL, Ascenti G, Vinci S, et al. Muscle fat-fraction and mapping in Duchenne muscular dystrophy: Evaluation of disease distribution and correlation with clinical assessments preliminary experience. *Skeletal Radiol*. 2012;
105. Arpan I, Willcocks RJ, Forbes SC, Finkel RS, Lott DJ, Rooney WD, et al. Examination of effects of corticosteroids on skeletal muscles of boys with DMD using MRI and MRS. *Neurology*. 2014 Sep 1;83(11):974.

106. Bonati U, Hafner P, Schädelin S, Schmid M, Naduvilekoot Devasia A, Schroeder J, et al. Quantitative muscle MRI: A powerful surrogate outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2015 Sep 1;25(9):679–85.
107. Hogrel JY, Wary C, Moraux A, Azzabou N, Decostre V, Ollivier G, et al. Longitudinal functional and NMR assessment of upper limbs in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2016 Mar 15;86(11):1022–30.
108. Barp A, Bello L, Caumo L, Campadello P, Semplicini C, Lazzarotto A, et al. Muscle MRI and functional outcome measures in Becker muscular dystrophy. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1).
109. Barnard AM, Willcocks RJ, Triplett WT, Forbes SC, Daniels MJ, Chakraborty S, et al. MR biomarkers predict clinical function in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2020 Mar 3;94(9):e897–909.
110. Naarding KJ, Reyngoudt H, van Zwet EW, Hooijmans MT, Tian C, Rybalsky I, et al. MRI vastus lateralis fat fraction predicts loss of ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2020;94(13):e1386–94.
111. Brogna C, Cristiano L, Tartaglione T, Verdolotti T, Fanelli L, Ficociello L, et al. Functional levels and MRI patterns of muscle involvement in upper limbs in Duchenne muscular dystrophy. 2018;1–11.
112. Lawson VH, Arnold WD. Multifocal motor neuropathy: A review of pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014;10:567–76.
113. Forbes SC, Arora H, Willcocks RJ, Triplett WT, Rooney WD, Barnard AM, et al. Upper and lower extremities in Duchenne muscular dystrophy evaluated with quantitative MRI and proton MR spectroscopy in a multicenter cohort. *Radiology.* 2020;295(3):616–25.
114. Willcocks RJ, Triplett WT, Forbes SC, Arora H, Senesac CR, Lott DJ, et al. Magnetic resonance imaging of the proximal upper extremity musculature in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol.* 2017 Jan 1;264(1):64–71.
115. Pennati F, Arrigoni F, LoMauro A, Gandossini S, Russo A, D'Angelo MG, et al. Diaphragm Involvement in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD): An MRI Study. *J Magn Reson Imaging.* 2020;51(2):461–71.
116. Bouchard JP, Brais B, Brunet D, Gould P V, Rouleau GA. Recent studies on oculopharyngeal muscular dystrophy in Québec. *Neuromuscul Disord.* 1997;7 Suppl 1:S22–9.
117. Medici M, Pizzarossa C, Skuk D, Yorio D, Emmanuelli G, Mesa R. Oculopharyngeal muscular dystrophy in Uruguay. *Neuromuscul Disord.* 1997;7 Suppl 1:S50–2.
118. Blumen SC, Nisipeanu P, Sadeh M, Asherov A, Blumen N, Wirguin Y, et al. Epidemiology and inheritance of oculopharyngeal muscular dystrophy in Israel. In: *Neuromuscular Disorders.* Neuromuscul Disord; 1997.
119. Rodríguez M, Camejo C, Bertoni B, Braida C, Rodríguez MM, Brais B, et al. (GCG)11 founder mutation in the PABPN1 gene of OPMD Uruguayan families. *Neuromuscul Disord.* 2005;15(2):185–90.
120. Brais B. Oculopharyngeal muscular dystrophy. In: *Handbook of Clinical Neurology.* 1st ed. Elsevier B.V.; 2011. p. 181–92.

121. Kroon RHMJM, Horlings CGC, de Swart BJM, van Engelen BGM, Kalf JG. Swallowing, Chewing and Speaking: Frequently Impaired in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis*. 2020 Aug 11;7(4):1–12.
122. Tabor LC, Plowman EK, Romero-Clark C, Youssof S. Oropharyngeal dysphagia profiles in individuals with oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurogastroenterol Motil*. 2018;30(4):1–6.
123. Garibaldi M, Pennisi EM, Bruttini M, Bizzarri V, Bucci E, Morino S, et al. Dropped-head in recessive oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2015;25(11):869–72.
124. Robinson DO, Wills AJ, Hammans SR, Read SP, Sillibourne J. Oculopharyngeal muscular dystrophy: a point mutation which mimics the effect of the PABPN1 gene triplet repeat expansion mutation. *J Med Genet*. 2006;43(5):e23.
125. Robinson DO, Hilton-Jones D, Mansfield D, Hildebrand GD, Marks S, Mechan D, et al. Two cases of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) with the rare PABPN1 c.35G>C; p.Gly12Ala point mutation. *Neuromuscul Disord*. 2011 Nov;21(11):809–11.
126. Nishii Y, Noto Y, Yasuda R, Kitaoji T, Ashida S, Tanaka E, et al. A Japanese case of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) with PABPN1 c.35G>C; p.Gly12Ala point mutation. *BMC Neurol*. 2021 Dec 1;21(1).
127. Richard P, Trollet C, Stojkovic T, De Bececlievre A, Perie S, Pouget J, et al. Correlation between PABPN1 genotype and disease severity in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurology*. 2017;88(4):359–65.
128. Blumen SC, Brais B, Korczyn AD, Medinsky S, Chapman J, Asherov A, et al. Homozygotes for oculopharyngeal muscular dystrophy have a severe form of the disease. *Ann Neurol*. 1999;46(1):115–8.
129. Wong VA, Beckingsale PS, Oley CA, Sullivan TJ. Management of myogenic ptosis. *Ophthalmology*. 2002 May;109(5):1023–31.
130. Chen JJ, Allen RC. Oculopharyngeal Muscular Dystrophy [Internet]. *EyeRounds.org*. 2012 [cited 2021 Sep 30]. Available from: <https://webeye.ophth.uiowa.edu/eyeforum/cases/147-oculopharyngeal-muscular-dystrophy.htm>
131. Coiffier L, Périé S, Laforêt P, Eymard B, St Guily JL. Long-term results of cricopharyngeal myotomy in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2006;135(2):218–22.
132. Mathieu J, Lapointe G, Brassard A, Tremblay C, Brais B, Rouleau GA, et al. A pilot study on upper esophageal sphincter dilatation for the treatment of dysphagia in patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 1997;7(SUPPL. 1):100–4.
133. Gómez-Torres A, Abrante Jiménez A, Rivas Infante E, Menoyo Bueno A, Tirado Zamora I, Esteban Ortega F. Miotomía del cricofaríngeo en el tratamiento de la distrofia muscular oculofaríngea. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2012;63(6):465–9.
134. Youssof S, Schrader RM, Romero-Clark C, Roy G, Spafford M. Safety of botulinum toxin for dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2014 Apr;49(4):601–3.
135. Restivo DA, Marchese Ragona R, Staffieri A, de Grandis D. Successful botulinum toxin treatment of dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Gastroenterology*. 2000;119(5):1416.

136. Manjaly JG, Vaughan-Shaw PG, Dale OT, Tyler S, Corlett JCR, Frost RA. Cricopharyngeal dilatation for the long-term treatment of dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Dysphagia*. 2012;27(2):216–20.
137. Périé S, Trollet C, Mouly V, Vanneaux V, Mamchaoui K, Bouazza B, et al. Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. *Mol Ther*. 2014;22(1):219–25.
138. Malerba A, Klein P, Bachtarzi H, Jarmin SA, Cordova G, Ferry A, et al. PABPN1 gene therapy for oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Commun*. 2017 Mar 31;8.
139. Harish P, Malerba A, Dickson G, Bachtarzi H. Progress on gene therapy , cell therapy and pharmacological strategies towards the treatment of Oculopharyngeal Muscular Dystrophy School of Biological Sciences , Royal Holloway – University of London , Surrey , UK School of Pharmacy and Biomolecular Scie. :1–17.
140. Nagashima T, Kato H, Kase M, Maguchi S, Mizutani Y. Oculopharyngeal muscular dystrophy in a Japanese family with a short GCG expansion (GCG) 11 in PABP 2 gene. 2000;10:173–8.
141. Bilgen C, Bilgen IG, Sener RN. Oculopharyngeal muscular dystrophy: Clinical and CT findings. *Comput Med Imaging Graph*. 2001;25(6):527–9.
142. King MK, Lee RR, Davis LE. Magnetic resonance imaging and computed tomography of skeletal muscles in oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2005;6(3):103–8.
143. King MK, Lee RR, Davis LE. Magnetic Resonance Imaging and Computed Tomography of Skeletal Muscles in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. 2005;103–8.
144. Chang MH, Chang SP, Cheung SC, Kong KW. Computerized tomography of oropharynx is useful in the diagnosis of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 1993 Mar;16(3):325–8.
145. Fischmann A, Gloor M, Fasler S, Haas T, Rodoni Wetzler R, Bieri O, et al. Muscular involvement assessed by MRI correlates to motor function measurement values in oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol*. 2011;258(7):1333–40.
146. Gloor M, Fasler S, Fischmann A, Haas T, Bieri O, Heinemann K, et al. Quantification of fat infiltration in oculopharyngeal muscular dystrophy: Comparison of three MR imaging methods. *J Magn Reson Imaging*. 2011;33(1):203–10.
147. van der Sluijs BM, Lassche S, Knuiman GJ, Kusters B, Heerschap A, Hopman M, et al. Involvement of pelvic girdle and proximal leg muscles in early oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2017;27(12):1099–105.
148. Pompe JC. Over idiopatische hypertrophie van het hart. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1932;76(304).
149. Hers HG. alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). *Biochem J*. 1963;86(1959):11–6.
150. Meena NK, Raben N. Pompe disease: New developments in an old lysosomal storage disorder. Vol. 10, *Biomolecules*. MDPI AG; 2020. p. 1–19.
151. van der Ploeg AT, Kruijshaar ME, Toscano A, Laforêt P, Angelini C, Lachmann RH, et al. European consensus for starting and stopping enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year experience. *Eur J Neurol*. 2017;24(6):768–e31.

152. la Marca G. La organización del cribado neonatal en Italia: comparación con Europa y el resto del mundo. *Rev Esp Salud Publica*. 2021;95:1–9.
153. Wasserstein MP, Caggana M, Bailey SM, Desnick RJ, Edelmann L, Estrella L, et al. The New York Pilot Newborn Screening Program for Lysosomal Storage Diseases: Report of the First 65,000 Infants. *Genet Med*. 2019 Mar 1;21(3):631.
154. Bronstein MG, Pan RJ, Dant M, Lubin B. Leveraging evidence-based public policy and advocacy to advance newborn screening in California. *Pediatrics*. 2019 Feb 1;143(2).
155. Momosaki K, Kido J, Yoshida S, Sugawara K, Miyamoto T, Inoue T, et al. Newborn screening for Pompe disease in Japan: report and literature review of mutations in the GAA gene in Japanese and Asian patients. *J Hum Genet*. 2019 Aug 1;64(8):741–55.
156. Richardson JS, Kemper AR, Grosse SD, Lam WKK, Rose AM, Ahmad A, et al. Health and economic outcomes of newborn screening for infantile-onset Pompe disease. *Genet Med*. 2021 Apr 1;23(4):758–66.
157. Chien YH, Lee NC, Chen CA, Tsai FJ, Tsai WH, Shieh JY, et al. Long-term prognosis of patients with infantile-onset pompe disease diagnosed by newborn screening and treated since birth. *J Pediatr*. 2015;166(4):985–991.e2.
158. Li C, Desai AK, Gupta P, Dempsey K, Bhambhani V, Hopkin RJ, et al. Transforming the clinical outcome in CRIM-negative infantile Pompe disease identified via Newborn Screening: The benefits of early treatment with enzyme replacement therapy and immune tolerance induction. *Genet Med*. 2021 May 1;23(5):845.
159. van der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, Escolar DM, Florence J, Groeneveld GJ, et al. A Randomized Study of Alglucosidase Alfa in Late-Onset Pompe's Disease. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1396–406.
160. Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, et al. Recombinant human acid α -glucosidase: Major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology*. 2007;68(2):99–109.
161. Diaz-Manera J, Kishnani PS, Kushlaf H, Ladha S, Mozaffar T, Straub V, et al. Safety and efficacy of avalglucosidase alfa versus alglucosidase alfa in patients with late-onset Pompe disease (COMET): a phase 3, randomised, multicentre trial. *Lancet Neurol*. 2021;20(12):1012–26.
162. Dhillon S. Avalglucosidase alfa: First Approval. Vol. 81, *Drugs*. Drugs; 2021. p. 1803–9.
163. Segovia S, Llauger J, Belmonte I, Pedrosa I, Pompe S, Group S, et al. Muscle MRI Findings in Childhood / Adult Onset Pompe Disease Correlate with Muscle Function. 2016;1–19.
164. Del Gaizo A, Banerjee S, Terk M. Adult onset glycogen storage disease type II (adult onset Pompe disease): Report and magnetic resonance images of two cases. *Skeletal Radiol*. 2009;38(12):1205–8.
165. Alejaldre A, Díaz-Manera J, Ravaglia S, Tibaldi EC, D'Amore F, Morís G, et al. Trunk muscle involvement in late-onset Pompe disease: Study of thirty patients. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(SUPPL. 2):148–54.
166. Gruhn KM, Heyer CM, Güttsches A-K, Rehmann R, Nicolas V, Schmidt-Wilcke T, et al. Muscle imaging data in late-onset Pompe disease reveal a correlation between the pre-existing degree of lipomatous muscle alterations and the efficacy of long-term enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab Reports*. 2015 Jun 1;3:58.

167. Pichiecchio A, Rossi M, Cinnante C, Colafati GS, De Icco R, Parini R, et al. Muscle MRI of classic infantile pompe patients: Fatty substitution and edema-like changes. *Muscle and Nerve*. 2017;55(6):841–8.
168. Chien YH, Lee NC, Hwu WL, Fang JY. Disease progression in a pre-symptomatically treated patient with juvenile-onset Pompe disease – need for an earlier treatment? Vol. 25, *European Journal of Neurology*. *Eur J Neurol*; 2018. p. e111.
169. Pichiecchio A, Poloni GU, Ravaglia S, Ponzio M, Germani G, Maranzana D, et al. Enzyme replacement therapy in adult-onset glycogenosis II: Is quantitative muscle MRI helpful? *Muscle and Nerve*. 2009 Jul;40(1):122–5.
170. Ravaglia S, Pichiecchio A, Ponzio M, Danesino C. Changes in skeletal muscle qualities during enzyme replacement therapy in late-onset type II glycogenosis : temporal and spatial pattern of mass vs . strength response. 2010;737–45.
171. Ploeg A Van Der, Carlier PG, Carlier R, Kissel JT, Schoser B, Wenninger S, et al. Prospective exploratory muscle biopsy , imaging , and functional assessment in patients with late-onset Pompe disease treated with alglucosidase alfa : The EMBASSY Study. 2016;119:115–23.
172. Carlier PG, Marty B, Scheidegger O, Loureiro De Sousa P, Baudin PY, Snezhko E, et al. Skeletal Muscle Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy as an Outcome Measure for Clinical Trials. Vol. 3, *Journal of Neuromuscular Diseases*. IOS Press; 2016. p. 1–28.
173. Figueroa-Bonaparte S, Llauger J, Segovia S, Belmonte I, Pedrosa I, Montiel E, et al. Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: A prospective study. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–11.
174. Wary C, Laforêt P, Eymard B, Fardeau M, Leroy-Willig A, Bassez G, et al. Evaluation of muscle glycogen content by ¹³C NMR spectroscopy in adult-onset acid maltase deficiency. *Neuromuscul Disord*. 2003;13(7–8):545–53.
175. Périé S, Mamchaoui K, Mouly V, Blot S, Bouazza B, Thornell LE, et al. Premature proliferative arrest of cricopharyngeal myoblasts in oculo-pharyngeal muscular dystrophy: Therapeutic perspectives of autologous myoblast transplantation. *Neuromuscul Disord*. 2006;16(11):770–81.
176. Piñol-Jurado P, Gallardo E, de Luna N, Suárez-Calvet X, Sánchez-Riera C, Fernández-Simón E, et al. Platelet-Derived Growth Factor BB Influences Muscle Regeneration in Duchenne Muscle Dystrophy. *Am J Pathol*. 2017;187(8):1814–27.
177. Fernández-Simón E, Carrasco-Rozas A, Gallardo E, Figueroa-Bonaparte S, Belmonte I, Pedrosa I, et al. PDGF-BB serum levels are decreased in adult onset Pompe patients. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
178. Hooijmans MT, Damon BM, Froeling M, Versluis MJ, Burakiewicz J, Verschuuren JJGM, et al. Evaluation of skeletal muscle DTI in patients with duchenne muscular dystrophy. *NMR Biomed*. 2015 Nov 1;28(11):1589–97.
179. Barp A, Carraro E, Albamonte E, Salmin F, Lunetta C, Comi G Pietro, et al. Muscle MRI in two SMA patients on nusinersen treatment: A two years follow-up. *J Neurol Sci*. 2020 Oct 15;417.

10

ANEXOS



10.1. ANEXO 1

El trabajo que se publicó en el *artículo 2* de esta tesis se planteó inicialmente como un estudio más amplio, que incluía pacientes con DMD, BMD, DYSF y FSH. Las siguientes tablas resumen los pacientes que se incluyeron y las correlaciones entre las pruebas funcionales y la RM muscular.

En cuanto a la metodología de análisis que utilizamos para las imágenes, como comentamos anteriormente, no existe un consenso sobre cuál es la mejor manera de hacerlo. Nosotros lo hicimos de la siguiente forma:

Las secuencias de miembros inferiores fueron obtenidas conforme a lo descrito en el *artículo 2*. Seleccionamos 5 cortes a nivel de muslos y otros 5 por debajo de la rodilla como muestra la *figura 6.1*.

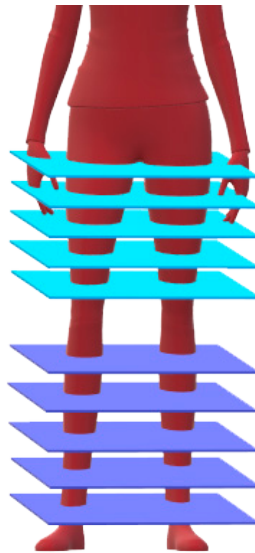


Figura 6.1: Representación esquemática de las secciones analizadas en el muslo y la pierna.

En cada uno de los cortes seleccionamos cada músculo dibujando manualmente su perímetro interior con ayuda del software proporcionado por Philips. Así obtuvimos la FF y el área de cada músculo para cada uno de los cortes, y calculamos la FF media de cada músculo.

Para estimar la cantidad de grasa en todo el muslo realizamos medias ponderadas, de forma que los músculos más grandes tienen mayor influencia en el cálculo total de grasa. El cálculo de FF total para un caso esquemático está representado en la **figura 6.2**.

$$FF_T = \frac{FF_A \times A_A + FF_B \times A_B + FF_C \times A_C}{A_A + A_B + A_C}$$

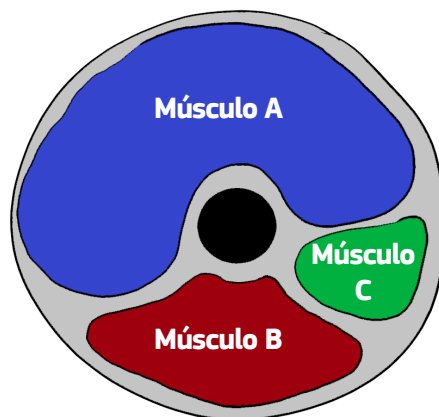


Figura 6.2: Representación esquemática de 3 músculos con distinto área en el muslo y fórmula para calcular la fracción grasa total.

FF_T : Fat fraction total. FF_A : FF del músculo A. A_A : Área del músculo A. FF_B : FF del músculo B. A_B : Área del músculo B. FF_C : FF del músculo C. A_C : Área del músculo C.

Las siguientes tablas resumen los pacientes que se incluyeron y las correlaciones entre las pruebas funcionales y la RM muscular.

1. Descripción de pacientes a los que se realizó RM muscular cuantitativa (2-punto Dixon)

	DMD	BMD	DYSF	FSH	Total
Número de pacientes	7	8	2	4	21
Edad	15±5.2	43±17.9	62	63±6.3	39±22.2
No ambulantes	6 (85.7%)	5 (62.5%)	1 (50%)	1 (25%)	13 (61.9%)
VNI	0	2 (25%)	0	0	2 (10%)
Tratamiento con corticosteroides	6 (85.7%)	0	0	0	6 (30%)

Tabla 1: la edad viene dada en años ± desviación estándar.

Las frecuencias están representadas como el número absoluto de pacientes seguido por el porcentaje entre paréntesis. **DMD**: distrofia muscular de duchenne. **BMD**: distrofia muscular de becker.

DYSF: disferlinopatía. **FSH**: distrofia facio-escápulo-humeral. **VNI**: Ventilación no invasiva.

2. Correlación entre el porcentaje de grasa en músculo y las pruebas funcionales. Para el cálculo de las correlaciones hemos agrupado los 21 pacientes en el mismo grupo. Para el análisis hemos utilizado la correlación de Spearman.

Test	FF muslo		FF pierna	
	Correlation coefficient	Spearman p-value	Correlation coefficient	Spearman p-value
10MWT		0.208	0.943	0.005
6MWT	-0.905	0.002	0.998	<0.001
Tup4	0.886	0.019		0.072
Tdo4	0.829	0.042	0.886	0.019
TUG	0.893	0.007	0.821	0.023
MRCT	-0.548	0.012		0.182
MFM-total	-0.742	<0.001	-0.654	0.004
MFM-D1	-0.717	0.001	-0.753	0.001
MFM-D2	-0.508	0.031		0.127
MFM-D3	-0.499	0.035		0.249

Tabla 2: FF: Fat fraction. **10MWT:** Test de los 10 metros (“10 meters run/walk test”); **6MWT:** Test de la marcha de los 6 minutos (“6 minutes walking test”); **Tup4:** Tiempo para subir 4 escalones (“Time to climb up 4 steps”); **Tdo4:** Tiempo para descender 4 escalones (“Time to descend 4 steps”), **TUG:** “Time up and go”. **MRCT:** sumatorio del Medical Research Council scale de todos los músculos. **MFM:** Motor Function Measurement score 20 items, resultado total. **MFM-D1:** Motor function Measurement score 20 items primera dimensión. **MFM-D2:** Motor function Measurement score 20 items segunda dimensión. **MFM-D3:** Motor function Measurement score 20 items tercera dimensión.

En azul hemos resaltado aquellos coeficientes de correlación altos (> 0.65). Se puede apreciar que los resultados de las pruebas funcionales correlacionan con la infiltración grasa muscular. Las siguientes gráficas son dos ejemplos de las correlaciones (se encuentran representados únicamente los pacientes ambulantes).

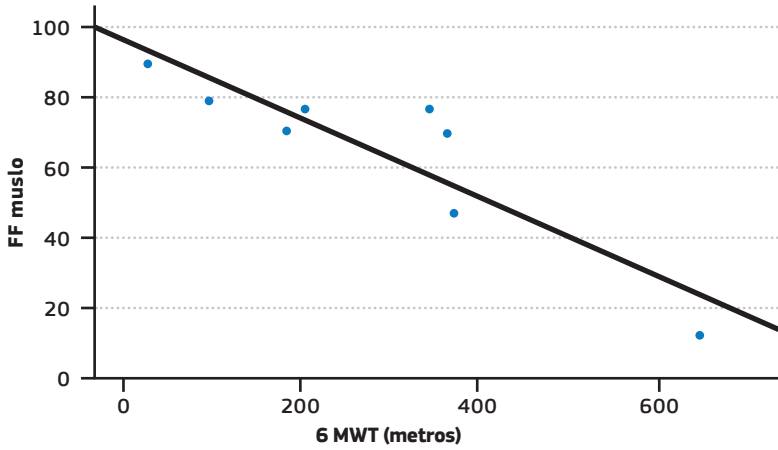


Figura 6.3: Correlación entre FF del muslo y la distancia recorrida en el 6MWT

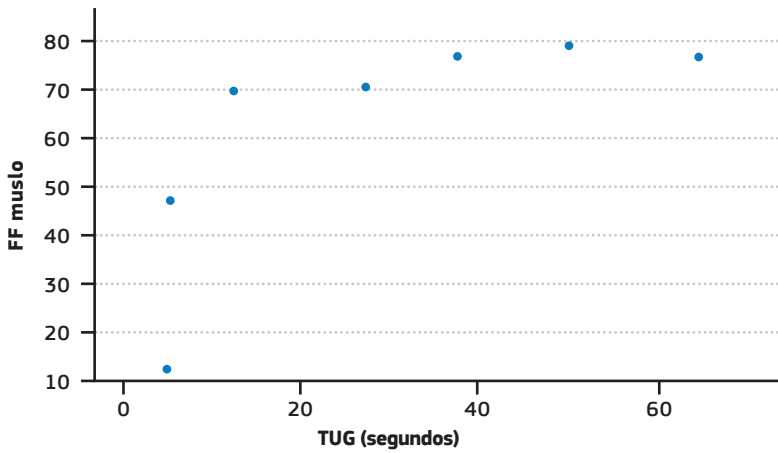


Figura 6.4: Correlación entre la FF del muslo y el tiempo requerido para incorporarse de la silla, recorrer 3 metros y volver a sentarse en la silla (Test Up & Go)

